

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Biología Celular



**SISTEMAS ALTERNATIVOS DE
CONSERVACIÓN, INTERCAMBIO Y
RECUPERACIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS
MURINAS BASADOS EN TÉCNICAS DE
BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Juan de Dios Hourcade Bueno

Bajo la dirección de los doctores

Belén Pintado
Alfonso Gutiérrez Adán

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-694-2082-9

© Juan de Dios Hourcade Bueno, 2010

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Biología Celular



**SISTEMAS ALTERNATIVOS DE CONSERVACIÓN,
INTERCAMBIO Y RECUPERACIÓN DE LINEAS TRANSGÉNICAS
MURINAS BASADOS EN TÉCNICAS DE BIOTECNOLOGÍA
REPRODUCTIVA**

Directores de Tesis

Dra. Belén Pintado

Dr. Alfonso Gutiérrez Adán

Juan de Dios Hourcade Bueno

Madrid, 2010



La Dra. M^a Belén Pintado Sanjuanbenito, con DNI 5.374.681-H, Investigadora responsable del Servicio de Transgénesis del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC) y el Dr. Alfonso Gutiérrez Adán, con DNI 13.751.214-C, Investigador Titular del Departamento de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos, del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) hacen constar:

Que la Tesis Doctoral titulada: **“SISTEMAS ALTERNATIVOS DE CONSERVACIÓN, INTERCAMBIO Y RECUPERACION DE LINEAS TRANSGENICAS MURINAS BASADOS EN TÉCNICAS DE BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA.”**, ha sido realizada por D. Juan de Dios Hourcade Bueno, Lcdo. en Bioquímica, bajo nuestra dirección y que tras su revisión, consideramos que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

Madrid, 21 de Junio de 2010

VºBº Directores

Fdo.: Belén Pintado Sanjuanbenito

Fdo.: Alfonso Gutiérrez Adán



EUROPEAN DOCTORATE MENTION

This thesis has been proposed for the European doctorate mention by virtue of the following European research stays and thesis reports:

Research stays:

- Reproduction and Early Development Group, LIGHT Laboratories, University of Leeds (Leeds, UK). Supervisor: Dr. David Miller. 2 months during 2008
- Génétique du Développement Normal et Pathologique INSERM Unité 636, Centre de Biochimie, Faculté de Sciences. Université de Nice-Sophia Antipolis. Supervisor: Dr. Mino Rassoulzadegan. 2 months during 2009

Thesis reports:

- Dr. Francisco Javier Salguero, Veterinary Laboratories Agency. Wewybridge, UK
- Dra. Yolanda Saavedra Torres. Biological Services, National Institute for Medical Research (NIMR), London, UK
- Dr. Joaquín Gadea Mateos, Dpto. de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Spain.
- Dra. Marta Torroba Cabeza de Vaca. Dpto. de Biología Celular (Morfología Microscópica), Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid. Spain.

Este trabajo ha sido realizado gracias a la concesión y disfrute de una Beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador, financiada por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) del Ministerio de Ciencia e Innovación

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han sido financiados a través de los proyectos de investigación AGL2006-04799, AGL2004-00332 y AGL2009-11358 concedidos por el Ministerio de Ciencia e Innovación a los Drs. Belén Pintado y Alfonso Gutiérrez-Adán

A mi abuelo, Pablo.
In memoriam

A mi abuela, Carmen

A mis padres, M^{ra} del Carmen y Juan Antonio

A mi tío, Ángel y a mi hermano, Luis María

A ti, mi risueña amiga

AGRADECIMIENTOS

Unas cuantas líneas para demostrar mi gratitud a todas aquellas personas que han hecho posible esta empresa.

Como siempre, hay que comenzar dando gracias, y en este caso desde lo más profundo del corazón a quien te da la oportunidad de trabajar en este mundo de la Investigación:

A la Doctora Belén Pintado. Mil gracias Belén de todo corazón porque supiste ver en mí valía para esta profesión. Gracias por enseñarme todo lo que sé acerca de la embriología y fisiología del ratón. Gracias por ser mi confidente y mi apoyo en este tiempo. Espero y deseo que el tiempo sea lo suficientemente largo para que vivas todo lo bueno que te mereces.

Al Doctor Alfonso Gutiérrez-Adán. Alfonso, sin tu inestimable ayuda y apoyo no hubiese sido posible finalizar este trabajo. Gracias por tu compañía en esos viajes transatlánticos y por esperarme en San Antonio; Espero que la vida te colme de todo aquello que anhelas, tanto en lo científico como en lo personal.

Sin embargo, el germen de estos años se remonta más atrás, cuando aún era estudiante de Bioquímica. Una persona especial, alguien a quien destacar, suscitó en mí curiosidad por este trabajo.

Gracias a la Doctora Laura Bravo Clemente; antes que cualquier otra persona confié en mí como científico permitiéndome trabajar a su lado. Mi querida amiga Laura. En todos estos años he pensado mucho en ti. Tu, has sido el principal motivo de que hoy yo pueda escribir estas líneas y llegue a ser Doctor. Los avatares que vivimos en aquellos momentos, nos unieron y la vez, nos separaron. Tiempo después, doy gracias por haberte encontrado. Gracias Laura.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral he podido visitar otros laboratorios, aprender cómo se hacen las cosas en otros lugares; impregnarme de otras formas de pensar.

Gracias al Doctor David Miller, profesor de la Universidad de Leeds (Reino Unido). Porque me permitió conocer un poquito más acerca del espermatozoide y en especial, sobre el ARN que porta. Thank you David for your help and attention during my visit to Leeds. Thanks to Carl Ambrose, Sarah, Emma...Indian food was great;

Gracias a la Doctora Minoo Rassoulzadegan, del laboratorio de Genética Normal y Patológica del Desarrollo del INSERM, en Niza (Francia). Por acercarme al mundo del miRNA y de sus implicaciones en la herencia. Merci Beaucoup.

AGRADECIMIENTOS

Como es lógico, los colegas de laboratorio juegan un papel importante; son las risas en los desayunos, la filosofía durante la comida, alguna copa que otra y las larguísimas jornadas que este mundo de la ciencia te hace vivir, los que permiten sobreponerse a los momentos difíciles.

Mi querido Raúl. Nunca pude ser el joven Padawan que requerías, pero siempre fui de la Fuerza. Momentos malos hubo...no cabe duda, pero el cariño y respeto a tu persona, nunca se debilitó. Gracias por todo¡¡.

Mi hermano Miguel. El hermano mayor que nunca tuve. Conversaciones, problemas, graves, menos graves, chistes malos, chascarrillos, rumores, cotilleos... Nunca dos personas, pudieron compartir tantas cosas. Tu bondad y tu corazón te hacen grande, MUY GRANDE¡¡

Mi confidente Eva. Revolucionaria particular. El empeño personificado. Luchadora por naturaleza, dura como una roca por fuera, todo sensibilidad en el fondo; costó llegar a ella; siempre, siempre mereció la pena. Gracias por tantos y tantos momentos, por tus consejos y por preocuparte de que no me dejara la vida en esto. Creo que no te hice todo el caso que merecías, pero lo intenté¡¡

Mi querida Mery. Un mes de diferencia nos unió en una carrera de fondo. Y al final aquí estamos. Congresos, salidas, copas, papers, posters impresos...siempre tuvimos nuestro ratito de conversación para intentar arreglar la cabeza; la nuestra porque la de otr@s era imposible¡¡¡¡ Gracias por hacerme el trayecto más llevadero.

Mi colega Pablo. El hombre de la PCR, nunca le vi en los desayunos, pero siempre tuvo su conversación en la comida, aunque fuese delante de sus "guisantes fluorescentes". Gracias por esos ratos a última hora de la tarde cuando no quedaba nadie en los laboratorios, en donde intentábamos "solucionar" este Mundo.

Mi Celi. Querida Celia. Llegaste al final, pero conectamos desde el primer momento. Tu tesón, tu disciplina, tu capacidad de aguantar la adversidad...entre otras cosas, te permitirán llegar al puerto adecuado. No pierdas el rumbo¡¡¡ Gracias por tu compañía y por ser como eres.

Sandruqui¡¡¡ Con una fortaleza sin igual y con las cosas claras. Una mujer de bandera¡¡¡ Persevera y llegarás. Mucha suerte en tu carrera.

Mi querido Alberto. El hombre cancha. También podría ser apodado Willy Fog. Nunca vi a nadie que sacase tanto provecho de un fin de semana y de Ryanair. Sus desayunos míticos, interminables, hacían que siempre tuviésemos tema de conversación. Gracias por los momentos buenos que tuvimos.

AGRADECIMIENTOS

Siempre les toca el último lugar y sin embargo en todos estos años he reivindicado la gran labor de apoyo que hacen cuidando de nuestros más preciados amigos, los ratones.

A mi queridas todas, Toñí, Raquel, Mari Luz, Bárbara, María, Paloma. Grandes charlas entorno al rincón de Juande. Compartiendo entusiasmo, madrugones, desayunos e inquietudes. Gracias a todas porque me habéis ayudado mucho y bien. Debéis estar satisfechas de ser quien sois y de trabajar como lo hacéis. Os deseo lo mejor.

Tengo que dar especiales gracias a todas aquellas personas que visitaron el laboratorio y con quienes compartí experiencias, muy gratas. Con quienes aprendí otra forma de ver la vida.

A mi querida Alicia, gracias por abrirme tu corazón, por dejar ver la sensibilidad y la emoción de verdad. Por compartir contigo tu casa, la compañía de Eduardo y Zoe. Mucha suerte en tu Zarapower de adopción.

A mi siempre querida Tere, gracias por la alegría, humor y todo lo bueno que aportaste durante el verano del 2008. Sin ti, esta Tesis no hubiese sido lo mismo, y tu lo sabes bien. Muchísima suerte en tu vida, y sólo te deseo una cosa...que seas feliz.

Gracias a Chavi, Serafín, Felipe, y a todos los que pasaron temporalmente por el laboratorio. Fue una experiencia compartir momentos con ellos.

Los amigos...siempre, siempre, estuvieron y me dieron alegrías.

Gracias, gracias, gracias y mil veces gracias a un grupo de personas muy importante, mis amigos. Rebeca, Yago y Maricarmen. David, María y Jesús. Aun siendo complicado ajustar agendas, los momentos compartidos han sido siempre de lo mejor. Los consejos, el desahogo, las tapas y todo lo que en este tiempo hemos compartido demuestran que los amigos de verdad están allá donde los necesites. Mil gracias por ser como sois, por la compañía y por todo lo que me dais. Espero me dejéis seguir estando a vuestro lado. De corazón, os quiero.

Y como siempre al final, pero no por ello menos importante a la gente que más cerca de ti se han encontrado y han aguantado las dificultades que este tiempo de tesis doctoral lleva consigo. Mi más sincero abrazo y cariño a todos aquellos que han aguantado, aguantan y aguantarán...porque aunque la profesión gana un Doctor, la gente que te quiere, pierde parte de ti en un tiempo que nunca más se va a volver a repetir.

A toda mi familia, por estar en todos los momentos que esta Tesis ha dado. Una madre nunca cesa en el empeño; hace lo imposible por animarte y devolverte al camino. Gracias mamá, sabes que esto también es tuyo, porque tú me has visto crecer. Mi padre me enseñó

AGRADECIMIENTOS

que el tesón y el trabajo bien hecho dan muchas satisfacciones. Gracias papá, al final este es el fruto de todo este tiempo, y aunque satisfecho, podría ser mejor. Lo que me has enseñado, también está aquí reflejado. A mi abuela, la mujer que más ha sufrido con todo esto. Algún que otro lloro y enfado por ver el sacrificio realizado y la poca recompensa. Gracias abuela por haberme cuidado durante mis treinta años, y especialmente en esta etapa. A mi hermano sólo se le puede dar un fuerte abrazo por lo que me da a cada momento y durante esta Tesis, con sus largas conversaciones a cerca de la Ciencia, de la Filosofía, de Dios y el Hombre. Que la bondad que portas y la belleza de tu alma lleguen a quien más lo necesiten. Mi tío Ángel, me enseñó que hay que aportar un punto de “viveza” a la vida. “Que me quiten lo bailao”, es una frase que es descriptiva por sí misma. Me hubiera ido mejor si parte de tu sabiduría la hubiese aplicado en este tiempo. Aquí tienes a tu sobrino Doctor!!!

A mis tíos Ángel, Juan Luis, Pilar, Rosana, Carmen, Carlos, Jesús, mis primos y primas. Porque aunque la distancia no ha permitido que compartierais conmigo el proceso de construcción de este proyecto, quiero ahora, que compartáis conmigo la felicidad de acabar una etapa. Sé que estáis orgullosos.

Y al final, aunque ni muchísimo menos la menos importante, sino casi más bien todo lo contrario. Con quien comparto alegrías y tristezas, con quien crezco cada día, como persona y como profesional. Tú me enseñaste a reencontrarme. Porque abriste de nuevo las ventanas de mi corazón, y me hiciste retomar la ilusión por vivir, porque siempre pensé que el amor es el motor del ser humano, y yo me estaba apagando. Mi pequeña, porque solo tú sabes lo que ha significado esto, gracias y mil veces gracias por acompañarme en la travesía. Espero que la vida nos permita seguir viendo el Mundo pasar delante de nosotros y nos siga concediendo la posibilidad de disfrutarnos. Te quiero.

Este trabajo es fruto del esfuerzo; aquello que durante su vida, con su ejemplo, me inculcó mi abuelo, Pablo. Allí donde estés, siéntete orgulloso, porque esto es tuyo. Gracias Abuelo.

Todos los protocolos experimentales en los que se emplearon animales de laboratorio, fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

INDICE

RESUMEN	27
SUMMARY	35
INTRODUCCIÓN	43
OBJETIVOS	51
OBJECTIVES	55
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	59
1.- SISTEMAS DE INTERCAMBIO DE EMBRIONES DE ESTIRPES MURINAS EN FRESCO	60
2.- TECNICAS DE CONSERVACION DE LINEAS TRANSGENICAS A LARGO PLAZO	60
2.1.- CONGELACIÓN DE EMBRIONES DE RATÓN	61
2.2.- CRIOCONSERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE RATÓN	63
2.3.- CRIOPRESERVACION DE OVOCITOS Y TEJIDO OVÁRICO	67
2.4 CONGELACIÓN DE CÉLULAS SOMÁTICAS	68
3.- TÉCNICAS PARA LA RECUPERACIÓN DE LINEAS CRIOPRESERVADAS EN FORMA DE ESPERMATOZOIDES	68
3.1.- FECUNDACION <i>IN VITRO</i> (FIV)	68
3.2.- INSEMINACION ARTIFICIAL EN EL RATÓN.	69
3.3 INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI).....	70
4.- LA ESTRUCTURA NUCLEAR DEL ESPERMATOZOIDE Y SU PAPEL EN EL ÉXITO REPRODUCTIVO	70
4.1.- ESTRUCTURA DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA.....	71
4.2.- FACTORES IMPLICADOS EN EL DAÑO NUCLEAR ESPERMÁTICO	72
4.3- EL DAÑO NUCLEAR ESPERMÁTICO Y SUS EFECTOS ESPECÍFICOS EN LA FERTILIDAD Y EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO	75
4.4.- METODOLOGÍAS PARA LA DETECCIÓN DE ANOMALÍAS EN LA CROMATINA ESPERMÁTICA	78
5. TRANSPORTE Y SELECCIÓN ESPERMÁTICA	83
5.1.- COMPORTAMIENTO EN LA COPULA E INSEMINACIÓN	83
5.2.- DISTRIBUCION DEL ESPERMA	84
5.3.- RESERVORIO ESPERMÁTICO	86
5.5.- INTERACCION CON LA ZP	89
6.-DEFECTOS ESPERMÁTICOS Y MODELOS PARA SU ESTUDIO.	90
6.1- MODELO DE ESTRÉS TERMICO	90
6.2 - MODELO DE RADIACION IONIZANTE.....	92
CAPÍTULO I LA CAPACIDAD DE TRACTO REPRODUCTIVO FEMENINO PARA SELECCIONAR ESPERMATOZOIDES CON ADN NO FRAGMENTADO POST-OVULACION DEPENDE DE LA FUENTE DEL DAÑO	95
RESUMEN	97
INTRODUCCIÓN	99
MATERIAL Y MÉTODOS	103
RESULTADOS	109
DISCUSIÓN	117

INDICE

CAPÍTULO II RECUPERACIÓN DE LÍNEAS MURINAS: COMPARACIÓN DE PROTOCOLOS DE CONGELACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i> E INSEMINACIÓN ARTIFICIAL INTRAVIDUCTAL CON ESPERMATOZOIDES CONGELADOS.....	123
RESUMEN	125
INTRODUCCIÓN	127
DISEÑO EXPERIMENTAL	129
MATERIAL Y METODOS	133
RESULTADOS	139
DISCUSIÓN	146
CAPÍTULO III TRANSPORTE DE EMBRIONES EN CONDICIONES DE NO CONGELACIÓN COMO ALTERNATIVA VÁLIDA PARA EL INTERCAMBIO DE LÍNEAS MURINAS ENTRE LABORATORIOS.	153
RESUMEN	155
INTRODUCCION	157
MATERIAL Y MÉTODOS	163
RESULTADOS	169
DISCUSIÓN	181
DISCUSIÓN GENERAL	189
CONCLUSIONES	197
CONCLUSIONS	201
BIBLIOGRAFÍA	205
ANEXO I. ABREVIATURAS	237
ANEXO II. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	243
ANEXO III. PUBLICACIONES Y CONGRESOS	251

RESUMEN

RESUMEN

El ratón es el modelo animal más ampliamente utilizado en investigación, con multitud de aplicaciones en las diferentes áreas de la ciencia. Sin embargo un factor limitante, la disponibilidad de espacio en los animalarios, impide poder alojar todas las líneas que serían deseables, obligando a eliminar algunas de las instalaciones o retrasando la creación o recepción de otras nuevas por falta literal de espacio. Esta situación es muy común en el caso de laboratorios donde se generan modelos murinos transgénicos. Dado el elevado número de líneas que puede llegar a darse mediante este procedimiento, y el esfuerzo humano y económico necesario para obtenerlas, es siempre aconsejable la utilización de técnicas que garanticen su conservación mediante sistemas de archivo basados en la criopreservación. Complementariamente al problema de la conservación, otro problema logístico importante es el intercambio de líneas entre los laboratorios. El intercambio de animales vivos es siempre un riesgo sanitario para la colonia receptora, lo que hace que muchos estabularios sólo acepten la entrada de embriones. El uso de embriones congelados para el intercambio implica una tecnología que no está al alcance de todos los centros y cuyo coste, considerable, puede evitarse.

El objetivo de esta Tesis fue doble, en primer lugar profundizar en los problemas de viabilidad de espermatozoides congelados de la estirpe de ratón que se utiliza de forma mayoritaria para los modelos de transgénesis en biomedicina, C57Bl/6, tratando de explorar alternativas técnicas que permitieran mejorar su eficiencia y que hagan de la criopreservación espermática una alternativa real para el archivo de líneas mutantes de ratón. En segundo lugar se planteó el simplificar la técnica de intercambio de estirpes entre instituciones basada en el uso de embriones buscando alternativas a la congelación para el transporte de embriones.

Entre los procedimientos para conservar líneas transgénicas, la criopreservación de espermatozoides ha experimentado un creciente interés entre otras razones por requerir un número sensiblemente menor de animales para obtener el material genético necesario para archivar una línea. Desafortunadamente hay un importante componente genético en la supervivencia espermática y avances recientes en las técnicas de congelación, han demostrado que en el espermatozoide de la estirpe C57Bl/6, la congelación compromete la capacitación posterior de los espermatozoides. Esta situación se ha intentado solventar con la incorporación de nuevas moléculas a las mezclas crioprotectoras. Sin embargo esta estrategia ya no es posible en aquellas dosis de espermáticas de líneas transgénicas y mutantes que se encuentran ya archivadas a lo largo de los diferentes repositorios mundiales. Dado que una de las causas descritas de la baja fertilidad es la presencia de espermatozoides muertos y la dificultad técnica que supone en esta especie el eliminarlos sin comprometer la viabilidad de los supervivientes, en esta Tesis Doctoral, se ha explorado la selección espermática *in vivo* e *in vitro* como alternativa. Para ello se ha estudiado la existencia de una posible selección en el útero materno y en la zona pelúcida del ovocito en base a nuevos parámetros moleculares (fragmentación de ADN) correlacionándolos con alguno de los caracteres espermáticos

clásicos (motilidad, morfología, grado de capacitación o integridad de membrana). Conocer los mecanismos que tienen lugar durante esta selección natural permitiría mejorar la eficiencia de las técnicas de reproducción asistida aplicadas a la recuperación de líneas murinas transgénicas y mutantes. También es importante estudiar bajo este prisma la inseminación artificial, una técnica desplazada por la fecundación *in vitro* y la transferencia de embriones debido a los altos porcentajes de efectividad de ambas técnicas. Sin embargo las ventajas que tendría la inseminación artificial en combinación con el espermatozoides congelado en la recuperación de líneas murinas no han sido analizadas en detalle.

Por todo ello se diseñó, en primer lugar y tal y como se refleja en el capítulo primero, un estudio *in vivo* e *in vitro* mediante el cual se analizó la capacidad de selección espermática por parte del útero materno y de la zona pelúcida del ovocito. Recurriendo a 2 modelos para inducir fragmentación del ADN, estrés térmico escrotal y radiación ionizante, se comprobó cómo el daño ocasionado a través de estas dos vías, hacía que los espermatozoides sufrieran alteraciones, en forma de roturas en ambas cadenas de ADN. Dado que desde hace unos años se viene aceptando la integridad del ADN como marcador de fertilidad, se quiso comprobar la existencia de capacidad de selección por parte tanto del tracto reproductivo femenino como de la zona pelúcida del ovocito, que favoreciera la fecundación con aquellos espermatozoides que presentaban una alta integridad en su ADN.

Los resultados mostraron que los espermatozoides con una mayor fragmentación de ADN se encontraban atrapados en las secciones bajas del útero (>60%), cerca de la zona de deposición del mismo. A medida que se analizaban los espermatozoides que alcanzaban las zonas próximas al oviducto, la integridad del ADN en ellos era mayor. Este mismo comportamiento se daba en los modelos de estrés térmico y radiación ionizante, donde la población de espermatozoides aislados de los oviductos de hembras cruzadas con machos tratados, eran portadores de ADN de mejor calidad. El análisis poblacional muestra que en el modelo de radiación ionizante, donde se comprueba coexistencia de espermatozoides con heterogeneidad en cuanto a la calidad del ADN que portan. La selección espermática se confirma además al analizar la capacidad fecundante de los espermatozoides procedentes de los diferentes tratamientos. *In vivo*, el 90% de las implantaciones daban lugar a fetos en el tratamiento con estrés térmico mientras que sólo el 30% de las implantaciones eran fetos en el caso de radiación gamma. Esta fenomenología se acentúa en el caso de los análisis de zona pelúcida, en donde en términos absolutos se unen espermatozoides con mejor calidad de ADN con respecto al conjunto global de espermatozoides que se encuentran en la gota de fecundación. Sin embargo en términos poblacionales, a la zona pelúcida se anclan tanto espermatozoides con ADN fragmentado como integro, sin mostrar diferencias con la situación control. Alterando las barreras naturales de selección de la zona pelúcida, mediante ICSI, los porcentajes de fecundación se situaron en torno al 40% pero la viabilidad hasta blastocisto disminuyó hasta valores comprendidos entre 6 y 30%, en función del tratamiento. En conjunto, la selección en la zona pelúcida requiere de un proceso previo que es llevado a cabo por el

útero. Cabe destacar que las poblaciones espermáticas con alta integridad de ADN corresponden, además con las poblaciones de espermatozoides motiles; se demuestra por tanto, por primera vez, una relación *in vivo* directa entre dos parámetros: la motilidad espermática y un nuevo marcador de fertilidad, la integridad del ADN espermático.

Constatada la selección espermática *in vivo* e *in vitro*, por la que espermatozoides con mayor integridad en su ADN y mejor motilidad, progresan hasta la zona de fecundación, el segundo trabajo de esta tesis Doctoral tuvo como objetivo implementar los protocolos de conservación espermática y estudiar la recuperación de las líneas congeladas mediante inseminación artificial. En primer lugar, utilizando los protocolos de congelación de espermatozoides con mayor difusión entre laboratorios se analizó el impacto de la congelación sobre la fragmentación del ADN espermático; se estableció una conexión con la fertilidad de estas muestras congeladas tratando de evaluar el modelo de selección descrito anteriormente mediante la técnica de inseminación artificial. Con el objeto de solventar el problema de la congelabilidad del espermatozoides de la estirpe C57Bl/6, se utilizaron dos rampas de congelación (-20°C/min y -40°C/min) en combinación con dos mezclas crioprotectoras diferentes (Rafinosa-leche descremada (RL) y Rafinosa-yema de huevo-glicerol (HG)). Todos los estudios se realizaron en la estirpe C57Bl/6, utilizando como control los híbridos B6CBAF1. La batería de contrastación seminal clásica (motilidad, integridad de membrana y acrosoma) mostró diferencias claras entre estirpes, constatándose un incremento significativo de la motilidad para la mezcla RL a -20°C/min, en la estirpe B6CBAF1. La estirpe C57Bl/6 mostró, en todos los tratamientos ensayados, un porcentaje muy bajo de fecundación (<10%). Con objeto de estudiar el papel de la fragmentación espermática como posible causa de la infertilidad post-congelación, se realizaron dos análisis de fragmentación de ADN espermático: TUNEL y COMET. El primero de ellos reveló un incremento en las poblaciones espermáticas fragmentadas en la estirpe B6CBAF1 (14% de la población, HG,-20°C/min) y en C57Bl/6 (12% de la población en todos los tratamientos a excepción de RL,-20°C/min), mientras que COMET demostró que poblacionalmente, el espermatozoides B6CBAF1 presenta una menor susceptibilidad a la fragmentación de ADN espermático en el tratamiento clásico (70% de la población espermática mantiene su ADN integro en RL, -40°C/min) mientras que la estirpe C57Bl/6 muestra un número de espermatozoides fragmentado significativamente superior al espermatozoides fresco (entre el 40%-60% de la población presenta ADN fragmentado en todos los tratamientos de congelación analizados). Dado que uno de nuestros objetivos era tratar de mejorar la fertilidad de dosis espermáticas congeladas con crioprotectores tradicionales, y basados en la capacidad de selección del tracto genital de la hembra, demostrado en el primer estudio, exploramos como alternativa la utilización de inseminación artificial. Para ello Se analizaron 3 dosis espermáticas (1000,10000 y 100000 spz/μl) y 2 estirpes de ovocito: B6CBAF1 y C57Bl/6. El espermatozoides B6CBAF1 mostró unos porcentajes mayores de fecundación en comparación con el espermatozoides C57Bl/6 no siendo importante el fondo genético del ovocito. Establecida la dosis espermática óptima, se realizaron inseminaciones con espermatozoides de la estirpe C57Bl/6 congelado con el procedimiento más habitual, RL-40°C/min y se comparó con la estirpe control

utilizada en todos los estudios. Los resultados demostraron porcentajes de embriones en dos células mayores que los obtenidos en fecundación *in vitro*, lo que le permitiría ser considerada una alternativa para la recuperación de líneas transgénicas con espermatozoides congelados de fondo C57Bl/6, aunque los resultados difícilmente justifican la complejidad de la técnica en su aplicación práctica.

Complementando las aplicaciones prácticas que a nivel espermático se han propuesto en esta Tesis Doctoral, analizamos una nueva aportación técnica basada en la manipulación de embriones de ratón. Existe una manifiesta necesidad de intercambiar líneas transgénicas entre laboratorios, sin embargo los costes y riesgos que conlleva son patentes. En esta Tesis Doctoral se ha estudiado una alternativa viable para el transporte de embriones sin detrimento de su capacidad de desarrollo *in vivo* evitando recurrir a la criopreservación. Los estudios se realizaron utilizando embriones en estadio de mórula y se analizaron los diferentes parámetros que podrían afectar al procedimiento. Entre ellos, el medio de cultivo, la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Teniendo en cuenta la posibilidad de inducir diapausa en el embrión de ratón mediante alteraciones de la temperatura, se contempló la posibilidad de utilizar temperaturas en torno a 4°C; así mismo se evaluaron 15° y 37°C como temperaturas alternativas, en todos los casos sin utilizar atmósfera controlada (CO₂ y humedad).

Puesto que la recuperación de embriones a partir del lavado de oviductos requiere una formación específica en técnicas reproductivas que no es frecuente en el personal de los animalarios y con objeto de simplificar el procedimiento, se evaluó si era posible transportar mórulas procedentes de cultivo *in vitro*; incluso valorar si estas mismas mórulas podrían ser enviadas contenidas en los propios oviductos, a laboratorios en los que sí existiese un personal cualificado que pudiese realizar la técnica de lavado.

Todos los procedimientos, a excepción del transporte de mórulas procedentes del cultivo *in vitro* y contenidas en el oviducto, se realizaron durante dos periodos de tiempo: 24 y 48 horas. Este tiempo se estableció como plazo en el que es posible realizar cualquier envío a cualquier parte del mundo. Adicionalmente, y con objeto de abundar en el conocimiento de los procesos moleculares que subyacen en el embrión, se analizó la expresión de varios transcritos correspondientes a genes con funciones clave para el desarrollo embrionario (apoptosis, metabolismo, comunicación celular y pluripotencia). Los resultados demostraron que el transporte de embriones en estadio de mórula desarrollados *in vivo* es más eficiente que el de aquellos que habían sido cultivados *in vitro* hasta el estadio de mórula y que la permanencia en los oviductos también influye negativamente. Nuestros resultados permiten establecer que es posible realizar transporte durante 24 h en cualquiera de las condiciones ensayadas, sin detrimento de la capacidad de implantación embrionaria obteniendo supervivencias que oscilaron entre el 60 y el 90%, lo que permite alcanzar un número de animales vivos suficiente para el re-establecimiento de una nueva línea en cualquier animalario con este procedimiento. Tras un periodo de 48 h a 15°C, existe un descenso en la viabilidad embrionaria (<10%), lo que hace que se aconseje el uso de las bajas temperaturas (4°C) para tiempos prolongados de

transporte. Desde el punto de vista molecular, se constató una alteración en los niveles de expresión de los transcritos correspondientes a retrotransposones (IAP y MuERV-L). Por otra parte, la alternativa de un transporte de mórulas contenidas en oviducto mostró un desarrollo *in vitro* muy bueno (>90%); sin embargo la capacidad de implantación y el desarrollo *in vivo* se vio afectado negativamente, haciendo desaconsejable su utilización.

Los resultados de esta Tesis han permitido constatar la mayor sensibilidad del ADN espermático de la estirpe C57Bl/6 a la criopreservación. También hemos demostrado en base a los estudios de selección espermática realizados, la capacidad del tracto genital femenino para realizar una selección de los espermatozoides más aptos conforme a los estudios de integridad de ADN mediante la relación existente entre este nuevo marcador de fertilidad y la motilidad espermática. Por último desde un punto de vista práctico, hemos podido demostrar que la inseminación artificial es una alternativa viable a la fecundación *in vitro* con esperma congelado de la estirpe C57Bl/6 que permite duplicar el número de embriones obtenidos en comparación con la técnica de fecundación *in vitro* utilizada habitualmente. Respecto a nuestro segundo objetivo, simplificar la tecnología para favorecer el intercambio de estirpes de ratón entre instituciones, hemos demostrado la posibilidad de aplicar técnicas efectivas para el transporte de embriones sin recurrir a la utilización de la criopreservación y que permiten una viabilidad suficiente de los embriones durante 48h, pudiendo concluir que el transporte a 4°C es el que asegura mayor supervivencia. Tanto el cultivo *in vitro* previo, como el transporte dentro de oviductos, aunque más sencillo desde un punto de vista técnico, comprometen significativamente la viabilidad, haciendo que su uso solo sea recomendable cuando no exista otra alternativa.

SUMMARY

SUMMARY

Mice are the most commonly used animal model in Research, with multiple applications in different fields. However, in mouse facilities, room availability is a limiting factor. As a consequence, not all the mice lines can be maintained in the facilities, some of them need to be eliminated and new lines cannot be introduced until some room is available. This situation is constant in those institutions where transgenic models are produced. Considering the great number of lines that are generated by this procedure and the important economic and human effort necessary to obtain them, it is always advisable to perform techniques based on cryopreservation that warrant the conservation of the transgenic lines. Parallel to this problem, another important necessity is the interchange of lines among laboratories. The exchange of live animals is always a health risk for the receptor colony; as a consequence, many facilities only accept embryos. The use of frozen embryos for this purpose requires a technology not available in all facilities.

The aim in this thesis was, firstly, to address the low viability of the post-thawed C57Bl/6 mouse spermatozoa exploring techniques that could improve the efficiency of mice sperm cryopreservation; C57Bl/6 is a strain used worldwide used as a model in biomedicine. The final goal was to promote sperm cryopreservation as real alternative for the achievement of mice mutant and transgenic lines. As a second aim of this thesis, our goal was to simplify the exchange of lines among institutions, searching for alternatives to shipment of frozen embryos.

Among the procedures carried out to preserve transgenic lines, sperm cryopreservation has gained a growing interest because it requires the use of a lower number of animals in order to obtain the necessary genetic material to archive a line. Unfortunately, the genetic background affects the sperm viability after the freeze-thawing procedure. Recent research studies have shown in C57Bl/6 that the sperm freeze-thawing procedure compromise sperm capacitation; the addition of new substances to the cryoprotector medium has been proposed as an alternative method to improve efficiency of the sperm cryopreservation procedure. However, this method cannot be applied to those transgenic and mutant sperm doses already archived in the different banks distributed around the world.

One of the causes of the freezing-thawed sperm low fertility is the presence of death spermatozoa in the sample. However, elimination of these spermatozoa without compromising the global sperm viability is difficult. For that reason, in this thesis, sperm selection *in vivo* and *in vitro* has been proposed as an alternative. To achieve this, we have evaluated the existence of sperm selection mechanisms in the maternal uterus and in the zona pellucida of the oocyte based on a new sperm quality marker DNA fragmentation that has been correlated with classic sperm parameters (motility, morphology, capacitation status, membrane integrity). To know the mechanisms involved in the sperm selection would be important in order to improve the efficiency of assisted reproduction techniques (ART) used in the recovery of mutant and

transgenic mice lines. One of the ART techniques that could be improved is the artificial insemination (AI). The advantages of performing AI with freeze-thawed spermatozoa to recover transgenic lines have not been evaluated.

In the first chapter, we performed several *in vivo* and *in vitro* experiments in which we analyzed the sperm selection ability of the uterus and the zona pellucida. We used two animal models, scrotal heat stress (42°C, 30 min) and γ -radiation to induce double strand breaks (DSBs) in the spermatozoa. We wanted to test if the female genital tract and the ZP can select sperm based on sperm DNA integrity, a new fertility marker. The results showed that the spermatozoa with higher sperm DNA fragmentation levels were those trapped in the lower uterus (>60%). Spermatozoa recovered from regions near the oviduct and present in the oviduct, showed a higher integrity of sperm DNA. We observed these results both in the heat-stressed group and in the γ -radiation group; in both models, the best quality spermatozoa were recovered from the oviduct. However, in the γ -radiation group, we found that DNA quality of spermatozoa in the oviduct was heterogeneous. Sperm selection was confirmed when sperm fertilizing ability of spermatozoa recovered from both treatments was analyzed. After natural mating, in the heat stressed group, 90% of the implantations developed; on the other hand, in the γ -radiation group, only 30% of the implantations progressed to live fetuses.

When sperm bound to ZP were analyzed, we observed, on average, that these spermatozoa had the best quality DNA. However, in terms of population distribution, both DNA-fragmented spermatozoa and spermatozoa with DNA integrity could bind to ZP; no differences were observed when these values were compared to those observed in the control group. When the natural barriers were over passed by performing intracytoplasmic sperm injection (ICSI), cleavage rate was around 40% but blastocyst yield was significantly reduced (6-30%, depending on the treatment). Considering all these data, sperm selection performed by the ZP requires a previous sperm selection mechanism that takes place in the uterus. Besides, we observe that the sperm populations in which sperm DNA integrity was high matched up with the sperm populations with high sperm motility. We showed, for the first time, an *in vivo* relationship between the sperm motility and a new fertility marker, the sperm DNA integrity.

Once we demonstrated sperm selection mechanisms *in vivo* and *in vitro* based on the fact that sperm with better DNA integrity and better motility reach the site of fertilization, the second chapter of the thesis aimed, firstly, to implement sperm cryopreservation protocols and , secondly, to propose the artificial insemination as a technique to recover frozen lines. Firstly, we compared the sperm cryopreservation protocols used in most laboratories and analyzed the effect of the freezing-thawed procedure on sperm DNA fragmentation; besides, these freezing-thawed samples were used to perform IA and fertility was assessed, evaluating the sperm selection model previously described. In order to improve the low sperm freezability of the strain C57BL/6, we used to different cooling rates (20°C/min and 40°C/min), in association with two

different cryoprotectant mixtures, raffinose-skimmed milk (RS) and raffinose-egg yolk-glycerol (HG). All experiments were performed in the inbred strain C57BL/6 and in the hybrid strain B6CBAF1, used as control; after analysis of classical parameters (motility, membrane and acrosome integrity), we observed significant differences between strains, sperm motility was significantly higher when RS at a cooling rate of -20°C was used in the B6CBAF1 strain. In the C57BL/6 strain, we observed a very low cleavage rate ($<10\%$) in all the treatments assayed. Another goal of this chapter was to study the sperm DNA fragmentation as a possible cause of the infertility observed when frozen-thawed samples were used. Sperm DNA fragmentation was assessed by TUNEL and COMET assays. The TUNEL assay revealed that sperm DNA fragmentation increased in the B6CBAF1 strain only when sperm was cryopreserved in HG at $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$; however, in the C57BL/6 strain, sperm DNA fragmentation increased in all frozen-thawed samples (12% of the population in all the treatments, except when the experimental condition of RL $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ was chosen). When COMET assay was performed, in terms of population, B6CBAF1 sperm showed a lower susceptibility to sperm DNA fragmentation (in the standard protocol, 70% of the sperm population had DNA integrity in RL, $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$); however, the C57BL/6 frozen-thawed sperm showed a higher sperm DNA fragmentation index than fresh sperm (around 40-60% of the population showed sperm DNA fragmentation in all the conditions assayed). Since one of our objectives was to improve fertility of samples frozen with standard cryoprotectants we proposed AI as an alternative to recover these samples. We chose this technique based on the ability of the female reproductive tract to select sperm shown in our first study. For this purpose, doses with three different sperm concentrations were used (1000, 10000 and 10000 spermatozoa/ μl) and two different mice strains as donors of oocytes (B6CBAF1 and C57BL/6). When B6CBAF1 sperm was used, cleavage rate was higher than that observed when C57BL/6 sperm was chosen, independently of the genetic background of the oocyte. After selecting the optimal sperm concentration of the doses (10000 spermatozoa/ μl), we performed IA technique with frozen/thawed C57BL/6 sperm, frozen using the standard protocol (RS, $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Cleavage rate observed after IA was higher than the cleavage rate observed when *in vitro* fertilization (IVF) was performed; for this reason, IA could be considered as an alternative for the recovery of transgenic lines of C57BL/6 genetic background stored as frozen sperm. However, given the technological complexity the results obtained hardly justify its practical application.

In this thesis, besides the improvements that we have carried out in protocols that involve sperm manipulation, we proposed a new technical contribution based on the manipulation of mouse embryos. There is a great need to share transgenic lines among laboratories, but transport of alive animals compromises welfare and poses a health risk. Exchange of frozen embryos is expensive and demands certain technical expertise. We propose a viable alternative to ship embryos without performing the cryopreservation protocols, which allows them to keep their ability to develop *in vivo*. These experiments were performed using mice morulae stage embryos. Different parameters that could affect the procedure were

assessed, such as, pH stability of culture media, temperature and storage length: 24 or 48 hours. Considering that diapauses can be induced in mouse embryos by changing temperature, we tested three transport temperatures: 4°C, 15°C and 37°C; in all groups, neither the humidity nor the CO₂ partial pressure were controlled.

We also evaluated the possibilities of shipping morulae cultured *in vitro* or even the oviducts containing the morulae in order to simplify the procedure and to overcome the technical difficulty of oviduct flushing. In those groups transport length tested was 24 hours. In addition, with the aim of knowing the molecular pathways that take place in embryo submitted to such conditions, we analyzed transcription of genes involved in different biological processes (apoptosis, metabolism, cellular contact). The results showed that any previous *in vitro* culture reduced significantly embryo viability. We also observed that transport of morulae inside the oviducts compromised embryo viability reducing significantly the number of alive fetuses obtained compared to embryos shipped in media. Our results showed that mice morulae can be shipped for 24 hours in any of the assayed conditions without detrimental effect on embryo implantation. Survival rates after shipment were about 60-90%, these results indicate that enough number of live animals can be obtained in order to re-establish a new line in any animal facility by the performance of the procedure described in the third chapter of this thesis. For longer shipments (48 hours), we recommend to keep embryos at 4°C, since at 15°C for 48 hours, embryo viability is significantly reduced (<10%). From the molecular point of view, we demonstrated that there is a significant difference in the retrotransposons (IAP and MuERV-L) mRNA expression levels however the remaining genes tested did not show any significant difference in expression profile that could explain the reduced viability observed after implantation. On the other hand, the proposed alternative in which morulae were shipped inside the oviducts showed an excellent *in vitro* embryo development up to the blastocyst stage (≈90%), but the ability of these embryos to implant and to develop *in vivo* was negatively affected. Based on these results, we do not recommend the shipment of the morulae inside the oviducts as a standard procedure, its use should be restricted to those situations in which oviduct flushing is not possible.

As a summary the results of this thesis have shown that sperm DNA of C57Bl/6 mice is more susceptible than C57CBAF1 sperm to damage when cryopreserved, with a significant increase of DNA fragmentation rates. Based on the sperm selection experiments, we have demonstrated the ability of the female reproductive tract to select the spermatozoa with higher DNA integrity and better motility. Besides, we have confirmed that AI with frozen-thawed C57BL/6 spermatozoa can be an alternative to IVF in order to recover a transgenic line whose sperm has been cryopreserved, since it allows to double the number of embryos obtained compared to IVF, however, from the technical point of view, it requires a substantially more elaborated procedure. Regarding the second objective of the thesis, to simplify the protocols to favor the shipment of mice strains among institutions, we have firmly demonstrated that there

SUMMARY

are good alternatives to cryopreservation. When these techniques are performed, embryo survival is guaranteed for at least 48 hours. The best *in vivo* viability is obtained when embryos are shipped at 4°C. Although the transport of *in vitro* cultured morulae and the shipment of embryos inside the oviducts are easier from the technical point of view, they should be used only when oviduct flushing is not possible, because with both protocols embryo viability is significantly reduced.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La utilización de animales de experimentación ha ido aumentando paulatinamente en las últimas décadas. La revolución que supuso la incorporación de las técnicas de transgénesis ha sido uno de las causas fundamentales, ya que ha permitido el desarrollo de numerosas líneas genéticamente modificadas fundamentalmente en roedores. La experiencia adquirida en las décadas de los 80 y de los 90 puso en evidencia la gran influencia de factores externos en las manifestaciones fenotípicas de estas líneas, lo que justifica la necesidad de un correcto alojamiento de los animales en cuanto a condiciones ambientales de temperatura, humedad, nivel de ruido, etc. Tan importante como el entorno ambiental es el estado sanitario de la colonia, ya que numerosos agentes patógenos pueden interferir de forma directa en los estudios científicos. Como consecuencia de ello cada día se diseñan instalaciones más sofisticadas tanto a nivel material como de personal y estrictas normas que limitan la entrada de animales a la colonia, obligando a realizar la cría dentro de las propias instalaciones.

Esta situación tiene dos consecuencias claras, por un lado podría chocar con uno de los principios éticos fundamentales de la experimentación animal, el principio de las 3Rs, reducción, refinamiento y reemplazo. Limitar el acceso de animales ya generados en otras instalaciones procedentes de intercambios científicos motivaría la necesidad de reproducir líneas genéticamente modificadas ya creadas, lo que contravendría el principio de reducir el número de animales usados en experimentación. La segunda consecuencia es que según se generan nuevas líneas, si no hay un sistema que permita su archivo sin implicar el mantenimiento de animales vivos, paulatinamente disminuye el espacio disponible para otros usuarios dentro del animalario, limitando el desarrollo de nuevas líneas de investigación. (Knight and Abbott, 2002). Por estas razones, en los animalarios modernos se hace imprescindible disponer de metodologías que permitan el archivo *ex vivo* de líneas y facilitar el intercambio entre animalarios y/o laboratorios, fomentando la colaboración científica pero sin comprometer el estatus sanitario de la colonia. El trabajo desarrollado en esta memoria ha abordado ambos aspectos

La generación de un animal transgénico es un proceso técnicamente muy complejo que tiene como resultado una línea única en sus características. Esta singularidad justifica la necesidad de garantizar su disponibilidad para la realización de diferentes estudios no sólo para el grupo investigador que la ha generado sino para toda la comunidad científica. Además es importante garantizar que esta información se conserve con la mayor integridad posible. Independientemente de la técnica utilizada para inducir la modificación genética, los animales generados deben transmitir el gen a la descendencia y, para algunos estudios, puede ser necesario que la modificación esté en homocigosis, es decir en ambos loci. Llegar al modelo adecuado requiere una serie de cruces y en las sucesivas generaciones se pueden dar circunstancias que alteren el fenotipo de la línea. Esta situación justifica la necesidad de a) establecer un mantenimiento de las líneas transgénicas con un protocolo exhaustivo que facilite

la diversidad genética evitando la pérdida del transgen y b) garantizar que se conserva el genoma original, sin alteraciones posteriores causadas por manipulaciones incorrectas, mutaciones espontáneas o alteraciones en la expresión causadas por cualquier proceso que lleve al silenciamiento de la construcción. Por esta razón, aunque la tónica habitual sea archivar las líneas por medio de un repositorio público cuando han sido caracterizadas completamente, tanto genotípica como fenotípicamente, siempre es una buena idea guardar material genético durante el desarrollo del proceso. De esta manera se dispone de un repositorio en caso de:

- a) Modificaciones genéticas o epigenéticas que se pueden dar sobre el transgén. En especial, cuando se trabaja con transgenes pequeños la inserción de múltiples copias o de transgenes que contienen abundante material procariota, el genoma del hospedador las considera como ajenas a él inactivándolas (Garrick et al., 1998; Houdebine, 2000)
- b) Un problema sanitario inesperado que puede suponer la necesidad de sacrificar la colonia

La decisión de archivar una línea de un modelo transgénico hace que surjan nuevas cuestiones acerca de qué debe ser conservado y cuál es el método más apropiado. Mientras que un archivo definitivo es más eficaz en forma de embriones, cuando se trata de conservar un material genético que permita recuperar una línea en una situación extraordinaria puede ser más apropiado recurrir a técnicas menos eficaces pero que requieren una inversión mucho menor de recursos animales y materiales. Es en este contexto donde la criopreservación de esperma en ratón está ganando un interés creciente y plenamente justificado.

Desde un punto de vista técnico, la congelación de espermatozoides no requiere de un equipamiento muy caro. Un número bajo de machos podrían producir suficientes muestras para fecundar cientos de ovocitos, así se vería reducido el espacio necesario para almacenar dichas dosis en el banco, en comparación con el espacio necesario para almacenar embriones. Este procedimiento también reduce significativamente el número de animales necesarios para crear un repositorio específico para una línea transgénica (Critser and Mobraaten, 2000). Sin embargo la mayor desventaja es la limitada capacidad del esperma congelado para fecundar ovocitos, especialmente grave en algunas estirpes de enorme interés en biomedicina, como es el caso de la C57Bl/6. Además la recuperación de la línea es más complicada al requerir la realización de una fecundación *in vitro*.

El espermatozoide es el responsable de la transmisión de la información genética paterna a los nuevos individuos. Sin embargo su única función no está exenta de obstáculos, pues la fecundación es una acción complicada que requiere de una serie de pasos ineludibles, desde el punto de vista fisiológico, que no siempre se acometen de la forma más adecuada. Un buen protocolo de congelación de espermatozoides debe asegurar la correcta transmisión de la

información genética; en concreto la recuperación tras la congelación requiere obtener una buena motilidad y una correcta integridad de membrana. La razón que hace que esto sea así es la necesidad de un patrón de movimiento adecuado que facilite la llegada del espermatozoide al ovocito. Si el espermatozoide presenta una membrana alterada será incapaz de experimentar el proceso de capacitación esencial para adquirir la capacidad fecundante. La mayoría de los estudios realizados en criopreservación del esperma de ratón han valorado la calidad de la técnica en base a parámetros de motilidad, integridad de membrana y capacidad fecundante, pero dado el fracaso de la metodología en ciertas estirpes como la C57Bl/6 que obliga a recurrir a técnicas más sofisticadas, como la Inyección intracitoplasmática de esperma (ICSI), es necesario utilizar otros parámetros de calidad. En ICSI la baja motilidad o integridad de membrana deja de ser un factor crítico, sin embargo sí lo es la integridad del ADN por su estrecha correlación con la fertilidad y el correcto desarrollo embrionario posterior a la fecundación. Por esta razón la fragmentación del ADN en el espermatozoide, es ya considerado en muchas especies como uno de los parámetros moleculares más importantes. Sin embargo su análisis en ratón ha sido bastante limitado y prácticamente nunca ha sido correlacionado con la criopreservación y la capacidad fecundante. Tampoco se ha establecido si es uno de los mecanismos de selección espermática que ocurren de forma natural. Esta laguna en la información ha motivado el desarrollo de parte de los estudios experimentales de esta memoria.

Si hasta este momento se ha estado hablando de lo importante que son los procedimientos para el archivo de líneas transgénicas no menos importante son aquellos que permiten el intercambio de animales entre laboratorios. Actualmente la normativa vigente respecto al transporte de animales vivos es muy estricta y requiere de permisos y documentación, a veces, complicados de conseguir, siendo necesario realizar en cada caso una evaluación de riesgos para el medio ambiente y la salud humana en caso de una liberación involuntaria. El transporte de embriones congelados en condiciones adecuadas es un sistema muy seguro, aunque se reduce la viabilidad tras la transferencia en comparación con embriones frescos. Además obliga a tener el personal y equipamiento adecuado para su congelación y descongelación y requiere la utilización de tanques de transporte especiales para garantizar el mantenimiento de la temperatura hasta la llegada. Estas condiciones, sin embargo, no son imprescindibles si el intercambio puede sincronizarse de tal forma que los embriones puedan reimplantarse en 24-48 h. Por todo ello, es muy interesante implementar protocolos de transporte de embriones en fresco que faciliten el intercambio de este tipo de material entre centros e instituciones haciéndolo extensible independientemente de los conocimientos del personal técnico o la disponibilidad de infraestructura.

En esta memoria se ha querido abordar 2 cuestiones muy importantes que afectan al funcionamiento de un animalario: la necesidad de archivar líneas transgénicas con garantías y la necesidad de intercambiar éstas entre instituciones sin utilizar el transporte de animales vivos.

Hemos querido acometer ambos temas con una doble perspectiva, no solo profundizando en el conocimiento científico, sino tratando también de aplicar éste en pautas de actuación frente a problemas concretos

Para establecer cuáles son los mejores criterios de selección y evaluación espermática *in vitro* es importante conocer cuáles son los mecanismos de selección espermática *in vivo*, en el tracto genital femenino. Desde que los espermatozoides son depositados en la vagina/útero hasta que llegan a la zona de fecundación, deben pasar un conjunto de obstáculos favoreciéndose la llegada de los espermatozoides más aptos para la fecundación. Hasta el momento, es bien sabido que los parámetros que más se correlacionan con selección espermática *in vivo* son la motilidad y la morfología (Suarez, 1987; Suarez, 2007; Suarez and Osman, 1987; Suarez and Pacey, 2006). Para atravesar la unión útero-tubal es necesario que el espermatozoide posea motilidad progresiva (Smith et al., 1988) sin embargo existen otras barreras de selección como es la zona pelúcida del ovocito y la membrana plasmática. En experimentos *in vitro*, han demostrado cuán importante es la integridad y morfología del espermatozoide (Liu and Baker, 1992a; Liu and Baker, 1992b; Liu and Baker, 1994) para anclarse a ella. Conocer los mecanismos por los que determinadas subpoblaciones espermáticas fecundan preferentemente frente a otras, permitiría establecer nuevos criterios o test de laboratorio para seleccionar los espermatozoides a utilizar en diferentes técnicas de reproducción asistida o tras ser sometidos a diferentes situaciones que comprometen su viabilidad, como es el caso de la criopreservación. De esa forma se asegura una correcta transmisión de la información genética paterna. Por esta razón el primer trabajo de esta memoria consistió en un estudio *in vivo* detallado de los mecanismos naturales de selección de espermatozoides. Los análisis pretendieron correlacionar la llegada a la zona de fecundación de los espermatozoides con la presencia de daño en su ADN. Además, estudios en ovocitos *in vitro*, pretendieron conocer si en la interacción espermatozoide-ovocito a través de la zona pelúcida, son los espermatozoides con baja fragmentación de ADN los que fecundan con mayor eficiencia.

En la segunda parte se ha realizado un estudio comparativo del protocolo clásico de congelación de espermatozoides de ratón (Nakagata, 2000) con otra mezcla crioprotectora basada en crioprotectores penetrantes. Se quiso evaluar asimismo el efecto de la rampa de congelación ya que se había encontrado en trabajos publicados un cierto efecto entre altas velocidades en la congelación junto con crioprotectores no penetrantes (Barbas and Mascarenhas, 2009; Dong et al., 2009; Fuller and Whittingham, 1997; Massip, 2001; Pegg, 2007; Toner et al., 1993) Además de los protocolos clásicos de contrastación espermática y fecundación *in vitro*, hemos incorporando el estudio de la integridad del ADN en los sistemas de evaluación de la calidad del esperma descongelado con el objetivo de obtener una imagen global de los diferentes protocolos y poder establecer si este carácter podría tener repercusión en la baja tasa de fertilidad del esperma congelado en la estirpe C57Bl/6. Por último, a la vista

de la capacidad de selección del tracto genital de la hembra y con el ánimo de traducir estos hallazgos en un protocolo práctico que permitiera recuperar líneas a partir de dosis espermáticas con una motilidad post-descongelación muy reducida, se ha estudiado la posibilidad de una inseminación oviductal como alternativa a fecundación *in vitro*.

La tercera sección experimental aborda la posibilidad de transportar embriones no congelados utilizando medios de cultivo o de manejo entre animalarios o laboratorios sin detrimento ni de su viabilidad *in vitro* ni de su desarrollo post-implantacional. Para ello, se evaluaron 3 diferentes temperaturas y dos medios de cultivo, así como la influencia de procedimientos que simplifiquen la recogida en la viabilidad de los embriones sometidos a transporte.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Comprobar si el tracto reproductivo femenino es capaz de establecer una selección de aquellos espermatozoides que son portadores de una óptima integridad de ADN; mediante dos modelos experimentales para inducir artificialmente la fragmentación del ADN espermático: el modelo del estrés térmico escrotal y el modelo de radiación ionizante.
2. Analizar la selección espermática *in vitro* que ejerce la zona pelúcida (ZP), evaluando la capacidad de ésta para permitir o bloquear el anclaje y/o penetrabilidad de los espermatozoides dependiendo del grado de integridad de su ADN nuclear.
3. Mejorar la eficiencia de la criopreservación de espermatozoides de ratón, implementando los protocolos de congelación basándonos en una evaluación rigurosa de la calidad espermática pre y post-descongelación que incluya, además de las pruebas utilizadas habitualmente, la determinación del grado de fragmentación del ADN y pruebas funcionales de viabilidad. Con ello se podrá determinar si la fragmentación espermática es un marcador de fertilidad en muestras de espermatozoides congelados de ratón de las estirpes C57Bl/6 y B6CBAF1
4. Comparar las técnicas de fecundación *in vitro* (FIV) e inseminación oviductal como métodos de recuperación de líneas archivadas mediante criopreservación
5. Facilitar el intercambio de líneas de ratón transgénicas y mutantes entre laboratorios sin necesidad de recurrir a técnicas de criopreservación embrionaria mediante la exploración de las condiciones óptimas (medio de cultivo y temperatura) para el transporte de embriones en estadio de mórula durante 24 o 48 h basándonos en:
 - 5.1 El análisis del desarrollo *in vitro*, la calidad de los blastocistos (la proporción de células de la masa interna celular ICM) y la capacidad de implantación tras transferencia de los embriones transportados a hembra pseudogestante.
 - 5.2 El análisis de la expresión de genes implicados en calidad embrionaria tras el periodo de transporte.

OBJECTIVES

OBJECTIVES

1. To verify if the female genital tract is able to select spermatozoa with optimal DNA integrity. Two animal models in which sperm DNA fragmentation is induced have been used: scrotal heat stress and gamma radiation models.
2. To analyze the *in vitro* sperm selection due to the zona pellucida, evaluating its ability to allow or to block spermatozoa binding depending on their DNA integrity.
3. To improve efficiency in the recovery of mice transgenic lines archived through sperm cryopreservation improving mouse sperm cryopreservation protocols in C57CB/6 and C57CBAF1 strains based in an rigorous evaluation of the sperm quality pre- and post-thawing that includes, apart from the routine techniques, the sperm DNA fragmentation assessment and the viability test with the objective of determining if sperm DNA fragmentation is a fertility marker in frozen-thawed sperm samples.
4. To compare the *in vitro* fertilization (IVF) technique and oviductal insemination as techniques to recover archived lines by cryopreservation.
5. To facilitate transgenic and mutant mice lines exchange among laboratories without performing embryo cryopreservation protocols exploring the optimal conditions (culture media and temperature for embryo transport at the morulae stage during 24 or 48 hours based on
 - 5.1. The evaluation of different parameters: *in vitro* embryo development, embryo quality tested by the analysis of the proportion of cells in the inner cell mass (ICM) and embryo implantation ability after transfer to pseudopregnant females.
 - 5.2. The analysis of expression levels of genes involved in embryo development in embryos submitted to different transport conditions.

REVISION BIBLIOGRAFICA

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La transgénesis es una de las herramientas que han contribuido de forma más decisiva a los avances recientes de la Biotecnología, la Biomedicina y la Biología Molecular. El campo de aplicación abarca tanto aspectos de investigación básica como aplicada, desde el estudio de los mecanismos de funcionamiento y control de un gen, a la incorporación de genes que implican la adquisición de una característica productiva que supone una ventaja en comparación con la especie genéticamente intacta. El avance imparable de variedades vegetales con mayor resistencia a enfermedades o con características cualitativa o cuantitativamente mejoradas es un preludio de la utilización futura de animales modificados genéticamente, ya sea como productores de materias primas mejoradas como es el caso de la leche (Pintado and Gutierrez-Adan, 1999), o con una mejor capacidad de adaptación a condiciones extremas climáticas o alimentarias y también como bancos de órganos o como modelos para el estudio de enfermedades humanas y animales.

Por múltiples motivos, todas estas investigaciones suelen realizarse en modelos murinos, que por sus características biológicas resultan más fáciles de mantener en instalaciones destinadas a la investigación. Sin embargo la situación en los animalarios de la gran mayoría de los centros de investigación está alcanzando unos niveles críticos de saturación. Además, la globalización de los estudios científicos y la filosofía de evitar en lo posible la duplicación de experimentos que impliquen el uso de animales, ha promovido el intercambio entre laboratorios de material biológico: tejidos, sueros, células y fundamentalmente ratones vivos, que suponen una serie de riesgos de diferentes tipos. Por un lado el riesgo sanitario para la colonia receptora (Martin-Caballero et al., 2003), y por otro, en el caso de animales genéticamente modificados, el riesgo que supone para el medio ambiente y la salud humana la liberación involuntaria de OMGs durante el transporte de animales vivos. Esta situación está específicamente contemplada en la ley 9/2003 sobre utilización confinada y comercialización de OMGs.

Estos problemas tan dispares (falta de espacio en los animalarios, riesgo sanitario y riesgo de una liberación involuntaria) tienen sin embargo una solución común: el desarrollo de un sistema eficiente de conservación de gametos y embriones de ratón que asegure la viabilidad a corto y largo plazo. El transporte de gametos o embriones de animales genéticamente modificados elimina de forma total el riesgo de una liberación involuntaria. Además si se dispone de sistemas de preservación a corto plazo que garanticen una viabilidad aceptable durante 24-48h podrían reducirse los costes elevados que supone el transporte en tanques secos de nitrógeno líquido o de animales vivos. Por último, pero tal vez lo más importante siguiendo unas medidas mínimas de buena práctica de laboratorio, la utilización de embriones permite asegurar la eliminación de la práctica totalidad de agentes patógenos, garantizando la seguridad sanitaria de la colonia receptora.

1.- SISTEMAS DE INTERCAMBIO DE EMBRIONES DE ESTIRPES MURINAS EN FRESCO

Las colaboraciones entre laboratorios de investigación cada vez más frecuentes, han hecho necesaria la mejora de los protocolos de transporte de animales de experimentación. La normativa sobre el uso de animales modificados genéticamente hace que sean más estrictos los controles sobre estos procedimientos ya que existe el riesgo de una liberación involuntaria de organismos modificados genéticamente (OMGs). El transporte de gametos y, concretamente, de embriones obliga a tener el personal y equipamiento adecuado para su recuperación en el laboratorio receptor. En el caso de utilizar material criopreservado (Gandini et al., 2007) hace que los costes se incrementen y sea necesario disponer de toda la infraestructura necesaria para el almacenamiento y conservación de los embriones recibidos hasta el momento de su transferencia a hembra pseudogestante.

Sin embargo no es esencial recurrir a la criopreservación para este proceso, y en determinadas circunstancias, la implementación de protocolos de transporte bajo condiciones de no congelación facilitaría el intercambio de este tipo de material entre centros e instituciones tanto desde el punto de vista técnico como de costes. En la literatura se encuentran descritas formas de transporte para embriones de otras especies (Davis, 1985) como caballo (Carney et al., 1991; Ribeiro et al., 2008) e incluso de gametos, como es el caso de espermatozoides de ratón (Kaneko et al., 2009) bajo diferentes condiciones y/o circunstancias diferentes a la congelación. Sin embargo, en el caso específico de embriones de ratón, las descripciones de los procedimientos para transporte de embriones están limitadas a trabajos en los que se han utilizados bajas temperaturas (Takeo et al., 2009) en estadio de 2 células, bien en medio de cultivo o bien contenidas en el oviducto del ratón. Estos demuestran que el sistema es posible pero no profundizan en las diferentes posibilidades, sus limitaciones y márgenes de seguridad para poder plantear este sistema como una alternativa real a la criopreservación.

2.- TÉCNICAS DE CONSERVACIÓN DE LINEAS TRANSGÉNICAS A LARGO PLAZO

La conservación de gametos y embriones a largo plazo soluciona el gran problema que supone en este momento la saturación de los animalarios por cientos de líneas transgénicas, que una vez producidas y caracterizadas, es necesario mantener a disposición de la comunidad científica. Salvo casos muy contados en que, por su excepcional valor científico, son admitidas en los archivos internacionales de líneas mutantes como el Jackson Laboratory en Estados Unidos o el EMMA en Europa (European Mouse Mutant Archive), es una responsabilidad que recae en los propios investigadores que las generaron o en los servicios de animalario de sus centros, comprometiendo en gran medida la posibilidad de acometer nuevas actividades por falta literal de espacio.

Por todo ello, a lo largo de los años se han ido desarrollando una serie de técnicas y protocolos que permiten, archivar estas líneas con eficiencia. Todo ello, será repasado a continuación.

2.1.- CONGELACIÓN DE EMBRIONES DE RATÓN

La crioconservación de embriones de ratón ha sido utilizada con resultados bastante satisfactorios desde que se publicó por primera vez el nacimiento de animales procedentes de embriones congelados (Whittingham et al., 1972). La necesidad de conservar líneas de ratones aumenta día a día como consecuencia de un aumento a nivel mundial del número de ratones genéticamente modificados que se producen con fines científicos y que deben de ser mantenidos para garantizar su disponibilidad evitando así cambios genéticos que se pueden producir en las líneas tras cruces sucesivos. Los embriones de ratón se congelan con mayor facilidad que otras especies mamíferas (Fahning and Garcia, 1992) y en muchos casos han servido para optimizar técnicas que posteriormente se han utilizado en especies domésticas. Su relativo pequeño tamaño junto a su relativamente bajo contenido en lípidos citoplasmáticos, hace que los crioprotectores actúen con más eficiencia que en otras especies, como por ejemplo el bovino o el porcino (Dobrinisky, 1997).

Se han congelado embriones de ratón por los tres métodos descritos hasta la fecha, congelación lenta, rápida y vitrificación (Mazur, 1990). Los primeros experimentos recurrieron a la congelación lenta, en la que se alcanza un equilibrio osmótico entre el medio intracelular y extracelular y que por ello requiere bajadas de temperatura lentas utilizando crioprotectores penetrantes, fundamentalmente glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) y etilenglicol.

En el sistema de congelación lento o método de equilibrio, es necesario lograr unas condiciones fisicoquímicas que permitan que la mayoría del agua que contiene la célula salga. El procedimiento busca adquirir un estado de sobre-enfriamiento del agua intracelular. Este es un estado que permite al agua permanecer no congelada en presencia de hielo externo. En esta situación, en la que las células tienden al equilibrio osmótico, en presencia de un ambiente exterior hiperosmótico debida a la cristalización del agua, el agua emplazada en el interior de la célula tiende a salir. Este procedimiento requiere una reducción lenta de la temperatura para sobre-enfriar el agua intracelular permitiendo así la salida de la misma a través de la membrana, antes que la temperatura llegue al punto en el que la cristalización tiene lugar. El control de la temperatura no es suficiente para asegurarse la supervivencia de las células, además para acelerar la salida de agua intracelular, es necesaria la adición de un agente crioprotector. Dos tipos diferentes de crioprotectores pueden ser utilizados: por una parte crioprotectores penetrantes como el glicerol, etilenglicol o DMSO y crioprotectores no penetrantes como la sacarosa o trehalosa, entre otros. Los crioprotectores penetrantes son pequeñas moléculas capaces de atravesar la membrana y sustituir el agua intracelular, acelerando el proceso de eliminación de agua intracelular. Se utilizan rampas de congelación

lentas (1°C cada 3 min) partiendo de temperatura ambiente hasta -35°C, -40°C o -80°C, en función del método de empaquetamiento, antes de sumergir las muestras en nitrógeno líquido (-196°C). Este procedimiento es relativamente lento y requiere de un estricto control del descenso de la temperatura, que se obtiene mediante el uso de un congelador programable. La utilización de éste supone el inconveniente del coste del aparato, pero tiene la ventaja de que al ser el aparato quien ejecuta el proceso en condiciones controladas, es altamente repetible, siendo la metodología de elección para manos inexpertas.

El método de congelación rápida surgió de investigaciones relacionadas con las características específicas de permeabilidad de membrana y resistencia a variaciones osmóticas. En este caso se produce cristalización, pero no se llega a un equilibrio osmótico del medio extra e intracelular. Se utilizan mayores concentraciones de crioprotector penetrante, entre 3 y 4,5 M en combinación con la presencia de crioprotectores no penetrantes del tipo de la sacarosa, y así se logró acelerar de forma notable el proceso de congelación sin necesidad de tener que recurrir procesos largos con equipos costosos. Los resultados de supervivencia son semejantes (Abas Mazni et al., 1989; Gutierrez et al., 1993) e incluso superiores a la congelación lenta o con equilibrio que se había utilizado inicialmente. La combinación y concentración de crioprotectores es altamente tóxica en exposiciones prolongadas, por lo que el procedimiento debe ser rápido y en algunas ocasiones a bajas temperaturas para minimizar el daño. Esto permite un pequeño margen de variaciones en los tiempos de exposición, complicando la manipulación. Sin embargo, el procedimiento reduce de forma considerable el tiempo requerido para congelar embriones de horas a minutos, siendo innecesaria la utilización de un congelador programable. El procedimiento completo puede ser realizado con un equipamiento básico, fácil de encontrar en cualquier laboratorio. Una vez el manipulador se ha familiarizado con el procedimiento y adquirido cierta competencia, las tasas de supervivencia son similares a los de la metodología clásica. El método rápido de congelación ha sido utilizado con éxito en rata (Chupin and De Reviers, 1986) y ratón (Abas Mazni et al., 1989). La única limitación es que no es una metodología aplicable a cualquier estadio del desarrollo embrionario, los mejores resultados se obtienen con mórulas (Parker-Thornburg et al., 2005).

La tercera forma de criopreservar embriones de ratón es la vitrificación. Este sistema definido por primera vez en 1985 (Rall and Fahy, 1985) se diferencia del sistema de congelación lenta no sólo porque no hay equilibrio entre medio intra y extracelular, sino además porque las velocidades de congelación y descongelación son mucho más rápidas, los crioprotectores del medio están en tal concentración que no se llegan a formar cristales conservándose las células en un estado “vítreo”, de ahí su nombre y su mayor diferencia con respecto a la congelación rápida, donde si se forman cristales. La vitrificación es un sistema técnicamente complejo de realizar por la extremada toxicidad de la solución crioprotectora, lo que implica que toda la actuación debe de realizarse a gran velocidad. Precisamente para aumentar esta velocidad se ha tenido que recurrir a geometrías de congelación que permitan

bajadas de temperaturas a velocidades superiores a los 500°C /min El sistema más conocido de este tipo es el OPS (Open Pulled Straw) que consiste en una pajuela de inseminación estirada en el fuego para que alcance un diámetro ligeramente superior al del embrión que contiene (Kong et al., 2000). Esta metodología tiene una clara aplicación en determinadas circunstancias, como es el caso de la congelación de embriones de cerdo y también para embriones en fases tempranas de desarrollo con células de gran tamaño. De hecho con vitrificación ha sido posible conservar ovocitos (Nakagata, 1989). Sin embargo su utilización requiere una destreza técnica bastante superior a los otros dos sistemas y los índices de supervivencia obtenidos no suponen una clara ventaja sobre técnicas de realización más sencilla.

Aunque la técnica de congelación tenga una eficiencia considerable en lo que se refiere a la supervivencia de los embriones *in vitro*, hay factores que pueden limitar su eficiencia real, es decir midiendo esta como el número de animales nacidos a partir de embriones transferidos. Uno de los factores que es de alguna forma una constante en el ratón es la diferente congelabilidad de los embriones según el fondo genético que se esté utilizando. Este factor puede suponer oscilaciones entre el 20-50% de supervivencia (Rall et al., 2000). Por último la baja respuesta a los tratamientos de superovulación de algunas estirpes consanguíneas (Hogan et al., 1994) puede ser un fuerte factor limitante para la conservación de las mismas mediante congelación de embriones y justificar la necesidad de utilizar espermatozoides como alternativa.

2.2.- CRIOCONSERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE RATÓN

La congelación de espermatozoides de ratón sigue siendo una meta por alcanzar su desarrollo va muy por detrás del de otras especies mamíferas. Mientras que en ovino se realizó la primera congelación con éxito en 1949, ha habido que esperar hasta 1990 para obtener descendencia de espermatozoides de ratón criopreservados (Tada et al., 1990). Los protocolos experimentales además eran difícilmente reproducibles y en la mayoría de los casos requerían la utilización de dosis en la fecundación *in vitro* con concentraciones muy superiores a las utilizadas con semen fresco (Songsasen and Leibo, 1997a). Las razones que explican este retraso técnico son muy variadas, por un lado la congelación del semen de ratón era más un desafío científico que una necesidad. La inseminación artificial en el ratón, aunque posible (Sato and Kimura, 2001), no había ofrecido ventaja práctica destacable en el pasado. Por otro lado como sistema de conservación de material genético valioso tampoco suponía una buena alternativa, como se ha mencionado anteriormente. La congelación de embriones de ratón descrita por primera vez a principios de los años 70 tiene una eficiencia muy aceptable y al descongelar precisa un único proceso de transferencia, frente al semen congelado que requiere un doble proceso técnico, primero una fecundación *in vitro* seguida de la transferencia.

El espermatozoide de ratón, tanto por su especial morfología como por su pequeño tamaño, condiciona que su congelabilidad sea inferior a la de otras especies (Sztein et al., 2000). Las características especiales de estos espermatozoides han sido motivo de gran controversia, Como ejemplo, aún existe polémica entre autores sobre el grado de resistencia de los espermatozoides al choque frío (Fuller and Whittingham, 1996; Kaneko et al., 2009). Como se ha expuesto, los primeros protocolos a principios de los 90 resultaban de difícil reproducibilidad, pero en los últimos años han empezado a ofrecer resultados más consistentes (Songsasen et al., 1997; Songsasen and Leibo, 1997a; Sztein et al., 2000) aunque solamente para poner en evidencia la tremenda importancia del fondo genético de la estirpe a congelar (Songsasen and Leibo, 1997b) como ya lo había demostrado con los embriones (Dinnyes et al., 1995).

El aumento exponencial del número de líneas transgénicas y mutantes en los últimos años y las características de muchas de ellas, así como la mejora técnica del proceso hace necesario revisar la utilidad de la conservación de las mismas por medio de espermatozoides. El semen recogido de un único donante permite obtener, al menos teóricamente, miles de embriones frente al número limitado 20-30 obtenido a partir de una hembra donante. Este hecho supone ahorrar espacio físico en el banco y reduce los animales necesarios para conservar la línea. Además es necesario reseñar que no siempre es esencial conservar la línea en homocigosis, en algunos casos los homocigotos son sencillamente inviables o infértiles. También el proceso de recogida de espermatozoides es más sencillo que la recuperación de embriones y por ello más asequible para diferentes laboratorios ya que entre otras cosas no requiere el tratamiento hormonal que precisan las hembras donantes. Además los márgenes de edad en las que los donantes son utilizables son mucho más amplios en los machos que en las hembras, las cuales difícilmente responden al tratamiento de superovulación por encima de las 12 semanas de edad. Por último mencionar nuevamente que en algunas estirpes la congelación de embriones no funciona lo suficientemente bien como para garantizar la conservación sin tener que almacenar un número muy elevado de los mismos.

La variabilidad ligada a las características genéticas de la estirpe que hemos mencionado es de gran trascendencia en el caso de animales transgénicos ya que la mayoría de las estirpes deben derivarse hacia la línea C57Bl/6 que es precisamente una de las que peor congela. Sin embargo la pérdida de motilidad de los espermatozoides descongelados no implica que hayan perdido su capacidad de transmitir la información genética, ya que espermatozoides que una vez descongelados carecían de toda motilidad sin embargo fueron capaces de dar lugar a descendencia tras utilizarse en un proceso de inyección intracitoplasmática (Kusakabe et al., 2001; Wakayama et al., 1998) y lo que es más importante, mediante una selección de los espermatozoides vivos una vez descongelados, retirando células muertas y restos del epidídimo se pueden obtener resultados aceptables (Bath, 2003), aunque es frustrante pensar que apenas un 10% de los espermatozoides sobreviven al

proceso de congelación, por ello es necesario seguir profundizando en la metodología de la congelación hasta dar con un sistema que permita unos resultados de supervivencia espermática aceptables.

De forma necesariamente resumida, podemos englobar las técnicas de congelación de espermatozoides de ratón en dos: una basada en la utilización de yema de huevo y glicerol (Songsasen and Leibo, 1997a) y otra basada en la utilización de leche descremada y crioprotectores no penetrantes fundamentalmente sacáridos del tipo de la rafinosa, a elevadas concentraciones y sin recurrir a crioprotectores penetrantes como el glicerol. Esta ausencia o presencia de crioprotectores penetrantes es posiblemente la diferencia técnica más destacable (Mazur et al., 2000) y aun en las que lo utilizan, las concentraciones son claramente inferiores a las definidas como óptimas para la correcta crioprotección de las células de ese tamaño. Posiblemente esa sea una de las causas de las contradicciones que se aprecian en los resultados publicados incluso con la misma técnica. Se ha descrito que el espermatozoide de ratón es especialmente sensible al glicerol, aunque no hay que pensar solamente en una toxicidad de tipo químico, también puede ser una consecuencia de la poca elasticidad de estos espermatozoides y su especial incapacidad a adaptarse a cambios volumétricos (Mazur et al., 2000). Hay otro factor que puede ser técnicamente importante, en muchos casos la recolección de los espermatozoides se realiza a 37 °C ya que la recogida es mucho más eficiente si el proceso se inicia a 37° que si se hace a temperaturas más bajas (Sztejn et al., 2000) sin embargo en manos inexpertas esto supone la permanencia de las células tiempos largos, 20-30 min en glicerol que además penetra con mayor velocidad ya que la permeabilidad de la membrana celular es mayor cuanto mayor la temperatura (Gao and Critser, 2000; Gao et al., 1993), con lo que un crioprotector que puede resultar de baja toxicidad a 0-4 °C puede resultar letal a 37°C.

Cualquier solución de congelación consta de una solución acuosa que transporta los llamados agentes crioprotectores, fundamentalmente de dos tipos, no penetrantes, y penetrantes. Los primeros se caracterizan por su incapacidad de atravesar la membrana celular y quedar siempre en el medio externo. A su vez los hay de dos tipos, por un lado de tipo proteico, tales como las proteínas de la yema de huevo, la leche o la albúmina sérica. Estos agentes aparentemente actúan estabilizando las membranas durante todo el proceso de enfriamiento y calentamiento posterior. También son crioprotectores no penetrantes, ciertos azúcares de diversos tipos, mono-, di- y trisacáridos que ejercen su poder crioprotector limitando las variaciones drásticas de volumen celular que se producen cuando la célula, frente a cambios de la presión osmótica del medio externo, trata de equilibrar el medio interno mediante la expulsión o absorción de agua y otro tipo de moléculas que si atraviesan la membrana (Gao and Critser, 2000). En este último grupo se engloban los llamados crioprotectores penetrantes, típicamente alcoholes de pequeño tamaño como el glicerol, el etilenglicol o el propanodiol entre otros y que atravesando la membrana celular. Estos

sustituyen el agua del medio interno celular evitando la formación de cristales de gran tamaño que son los causantes de daños físicos en las células. La combinación de estos agentes en un perfecto equilibrio es lo que garantiza la supervivencia de la célula durante el proceso de congelación y descongelación y sus concentraciones están muy directamente ligadas a las velocidades de enfriamiento y calentamiento, que han sido profusamente estudiados en las células espermáticas, aunque sorprendentemente las condiciones teóricamente más idóneas no son con mucho las que en la práctica dan mejores resultados (Mazur and Koshimoto, 2002).

Cuando se considera el archivo de espermatozoides como una alternativa a los embriones, es importante hacer notar que el espermatozoide no puede ser utilizado como forma de erradicar determinadas patologías. A diferencia de los embriones que pueden ser lavados varias veces en soluciones estériles y ser tripsinizados para eliminar restos celulares y los potenciales agentes patógenos procedentes de la muestra, los espermatozoides necesitan ser congelados inmediatamente después de su recolección, de forma diluida, siendo imposible deshacerse de residuos biológicos procedentes del macho donante. Por esta razón el archivo de espermatozoides se encuentra indicado en el caso de colonias con un estatus sanitario óptimo. Se recomienda el uso de donantes que estén libres de patógenos como se especifica en las recomendaciones de FELASA (Federation of Laboratory Animal Science Associations) para la monitorización del estatus sanitario. Recientemente se ha demostrado que la presencia de células del cúmulo durante la fecundación *in vitro* previene la transmisión del Mouse Minute Virus (Mahabir et al., 2009). Este resultado sugiere la posibilidad de recuperar animales libres de patógenos aunque la muestra espermática se encuentre infectada. Sin embargo, el riesgo de una contaminación debido a un error durante el manejo de la muestra se impone, justificando esta aproximación para la congelación de líneas transgénicas solamente en circunstancias extraordinarias. En estos casos, el análisis mediante PCR de los medios de lavado se consideraría una medida de seguridad adecuada (Janus et al., 2009). En algunos casos, las muestras podrían estar claramente marcadas y almacenadas en tanques específicos puesto que la contaminación cruzada de muestras espermáticas en el mismo tanque de nitrógeno líquido ya ha sido publicada (Bielanski et al., 2003).

La estirpe C57Bl/6 es posiblemente la estirpe consanguínea de ratón más ampliamente utilizada en Biomedicina. Por esta razón los principales protocolos de congelación desarrollados deberían implementarse en esta estirpe en particular (Nakagata, 2000). Sin embargo un gran número de líneas transgénicas creadas en fondo genético C57Bl/6 se han archivado por métodos muy ineficientes para esta estirpe (Nakagata, 2000), con el consiguiente problema a la hora de recuperarlas. Aparentemente, el principal problema de la estirpe C57Bl/6 es la incapacidad del espermatozoide descongelado para capacitarse correctamente (Choi and Toyoda, 1998; Takeo et al., 2008). La capacitación es un paso clave durante el proceso de fecundación, que precede a la reacción acrosómica. *In vitro* la capacitación es favorecida por la presencia de albúmina y bicarbonato que favorece, entre otros efectos, la liberación de

colesterol desde la membrana plasmática del espermatozoide. Este proceso desencadena una cascada de señales que inducen la capacitación. Desafortunadamente todas estas sustancias son incapaces de inducir la capacitación post-descongelación en esperma C57Bl/6. Recientemente se ha demostrado que la incorporación de la metil- β -ciclodextrina en el medio de descongelación facilita la movilización de colesterol de la membrana del espermatozoide, incrementando sustancialmente la proporción de ovocitos fecundados (Takeo et al., 2008). También se ha comprobado que el monotioglicerol favorece la fecundación (Ostermeier et al., 2008). Otras aproximaciones que han permitido mejorar la eficiencia de la fecundación *in vitro* con espermatozoides congelados de ratón ha sido la selección *in vitro* de espermatozoides motiles (Bath, 2003) o simplemente utilizar los mecanismos naturales de selección realizando una fecundación *in vivo* a través de inseminaciones artificiales (Pintado et al., 2008). En cualquiera de los casos e independientemente del protocolo utilizado es necesario disponer de una población de espermatozoides motiles después de la descongelación. Esta premisa, deja de ser necesaria cuando se utiliza la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) para recuperar la línea (Wakayama et al., 1998; Wakayama and Yanagimachi, 1998). Sin embargo, otros caracteres del espermatozoide si podrían ser limitantes en este caso particular, como se expondrá más adelante y es importante destacar que no están valorándose a través de las técnicas de contrastación habituales.

2.3.- CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS Y TEJIDO OVÁRICO

Los ovocitos son células que presentan una especial dificultad para ser congelados. La necesidad de conservar un huso meiótico funcional en la célula que permita el relanzamiento de la meiosis, determina por tanto la cantidad de daño sobre las células y como éste debe ser minimizado. Además, los ovocitos son grandes células, mayores que los blastómeros y por tanto la eliminación de agua es muy difícil. Solamente la vitrificación ofrece una alternativa válida a la congelación de ovocitos, pero necesariamente requiere de un descenso en la temperatura para evitar la cristalización lo que obliga a un tipo de contenedores muy específicos. Los más efectivos han resultado ser las open pulled straws (descrito anteriormente). Sin embargo, la congelación de ovocitos maduros no implica ninguna ventaja técnica con respecto a la congelación de embriones, puesto que son necesarios los mismos esfuerzos que para la recolección de embriones en lo que a tratamiento hormonal y respuesta ovulatoria se refiere y si un inconveniente, se guarda sólo la mitad de la información necesaria. Un verdadero avance lo constituiría la conservación de miles de ovocitos inmaduros presentes en un ovario. La limitación biológica mayor sería conseguir la maduración de estos gametos. La generación de animales mediante el xenotransplante de ovarios (Aubard, 2003) muestra el mecanismo. Pero hay barreras técnicas aun no resueltas que hacen que esta técnica aun no sea posible realizarla de forma rutinaria.

2.4 CONGELACIÓN DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Como último sistema mencionaremos la congelación de células somáticas, fundamentalmente a raíz de su utilización como sistema de recuperación de una línea a partir de un individuo conservado a -20°C más de 20 años. Esta proeza tecnológica (Ogonuki et al., 2006) permite recuperar una estirpe mutante a pesar de no haberse criopreservado material genético de forma intencionada.

3.- TÉCNICAS PARA LA RECUPERACIÓN DE LINEAS CRIOPRESERVADAS EN FORMA DE ESPERMATOZOIDES

La metodología utilizada para recuperar una línea criopreservada está íntimamente ligada al sistema de criopreservación utilizado, según se base en la utilización de embriones o gametos. En el primer caso, el único paso necesario tras la descongelación es la transferencia a hembras receptoras para que tenga lugar la gestación. Es decir el sistema más laborioso de criopreservación, o el que requiere una mayor utilización de animales, es el sistema más sencillo desde el punto de vista de la recuperación. Las técnicas basadas en la criopreservación de gametos requieren un paso previo, la fecundación, que puede conseguirse por diferentes métodos.

3.1.- FECUNDACIÓN *IN VITRO* (FIV)

Una de las técnicas reproductivas con mayor impacto es posiblemente la fecundación *in vitro* (FIV) como sistema de obtención de un gran número de embriones o como alternativa frente a ciertos problemas reproductivos, especialmente en medicina humana. El ratón, como otros muchos animales, es un modelo adecuado con el que poder analizar, evaluar y poner a punto técnicas que luego son trasladadas a la especie humana. Además, la fecundación *in vitro* en ratón, es una herramienta muy útil para obtener de una manera rápida un número elevado de embriones para la conservación y mantenimiento de líneas genéticamente modificadas. Al igual que en otras especies, con el desarrollo y perfeccionamiento de esta técnica, fueron apareciendo diferentes medios para llevar a cabo la FIV. En la actualidad los más utilizados son el medio Cook y el HTF (Aoki et al., 2005; Kito and Ohta, 2005). Siempre se ha buscado definir un medio que permitiera a los espermatozoides completar correctamente el proceso de capacitación previo a la fecundación y que garantizara unos buenos parámetros de viabilidad de membrana y motilidad (Si et al., 2009). Numerosos estudios han demostrado sin embargo la enorme variabilidad de resultados dependiendo del fondo genético (Sztein et al., 2000), la concentración espermática (Suh et al., 2006; Tsunoda and Chang, 1975), el tiempo de coincubación espermatozoide-ovocito (Palomo et al.), el tratamiento previo de los ovocitos y otros factores, entre los que destaca especialmente el hecho de utilizar espermatozoides frescos o descongelado, siendo estos últimos un claro factor limitante.

Para solventar la limitada capacidad fecundante de los espermatozoides congelados se han desarrollado diferentes estrategias; por ejemplo, disminuyendo el volumen de la gota de co-cultivo entre espermatozoides-ovocitos (Suh et al., 2006). Bajando desde los 500 μ l, habituales en una FIV con espermatozoides frescos hasta unos 25-50 μ l con espermatozoides congelados (Behr et al., 1990). De esta manera, la proporción espermatozoide/ovocito, aumenta. Se ha propuesto que las células del cúmulo podrían ser un impedimento para la fecundación con espermatozoides congelados, de hecho algunos autores han sugerido su eliminación para facilitar el acceso del espermatozoide. En ese sentido, la ZP es otra de las barreras que podría estar impidiendo una correcta fecundación por parte de espermatozoides congelados de ratón. Así, se han sugerido técnicas como la digestión parcial de ZP o la modificación de ZP mediante un pequeño corte, bien manual (Nakagata et al., 1997) bien mediante la utilización del piezo-eléctrico (Kawase et al., 2002), digestión química (Fan et al., 2009) o incluso la utilización de un láser (Kaneko et al., 2009) que debilitase la ZP. Todas ellas con el fin de facilitar el acceso y la fecundación por parte de los espermatozoides congelados. Otras aproximaciones han ido encaminadas a aumentar la selección de espermatozoides motiles, bien por filtración (Zavos et al., 1994; Zavos et al., 1995) en resinas tipo sephadex (Januskauskas et al., 2005; Lee et al., 2009), lana de vidrio (Kholkute et al., 1994), mediante la técnica clásica de swim up (Andolz et al., 1987) u otras similares como el aislamiento de espermatozoides motiles en gota (Bath, 2003). Un problema muy importante es la capacitación (Liu et al., 2009; Taguma et al., 2009) ya que en determinadas estirpes de ratón (ej. C57Bl/6) se ve impedida tras la congelación.

3.2.- INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN EL RATÓN.

A diferencia de otras especies domésticas, donde la inseminación artificial (IA) supuso la primera técnica de reproducción asistida con auténtico impacto, en ratón se utilizó de forma muy esporádica, posiblemente por el éxito de la FIV. A pesar de que la IA podría significar, por lo menos de forma teórica, un paso menos en el proceso de recuperación de una línea a partir de espermatozoides, la práctica demostró que esto no era cierto. En teoría la inseminación artificial de una hembra pseudogestante cuando ésta dispusiera de ovocitos maduros permitiría la obtención de descendencia en un único paso. Inicialmente se realizaron inseminaciones vía vaginal o la inyección de espermatozoides mediante laparotomía (Wolfe, 1967). Además del problema de inducir una correcta pseudogestación, con estos métodos, es necesario un número importante de espermatozoides para obtener gestaciones (Takeshima and Toyoda, 1977). Nakagata (Nakagata, 1992) fue la primera en desarrollar un nuevo método de inseminación en ratón inyectando los espermatozoides epididimarios en el ámpula del oviducto (desde ahora llamada transferencia intraoviductal de espermatozoides "IOTS"). Sato y Kimura (2001) desarrollaron una nueva técnica mediante la cual se inyectaban espermatozoides en el espacio cercano al infundíbulo, dentro de la bolsa (Sato and Kimura, 2001). Esta técnica presenta ventajas frente a otras, como por ejemplo el volumen necesario para la fecundación (posiblemente por encima de 10 μ l), lo que resultaría una ventaja en caso de utilizar espermatozoides congelados.

congelado. Evitando además las alteraciones en el microambiente del oviducto debido al volumen inyectado que afectan los resultados (Sato et al., 2002).

3.3 INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI)

La Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI) es una técnica de reproducción asistida ampliamente usada en casos de infertilidad humana de origen masculino. La técnica consiste en la introducción de un único espermatozoide en el interior del citoplasma de un ovocito maduro (en estadio de metafase II -MII-) con la ayuda de un micromanipulador, evitando el proceso de unión del espermatozoide a la zona pelúcida del ovocito y penetración a través de ésta y de la membrana plasmática. Con esta técnica se pueden obviar acontecimientos que sufren los espermatozoides como la capacitación y la reacción acrosómica, que tienen lugar en el tracto reproductor femenino, la maduración en el epidídimo e incluso la espermiogénesis en el testículo (Cummins et al., 1997). La ICSI permite conseguir fecundación y gestación incluso en casos extremos en los que se recupera un escaso número de espermatozoides apenas móviles. A pesar del grado de desarrollo en clínica humana, la experimentación con animales resulta útil para comprobar la seguridad de la propia técnica y para determinar las repercusiones genéticas inmediatas, y en sucesivas generaciones, que conlleva el uso de la técnica de la ICSI y otras técnicas de reproducción asistida (Cummins et al., 1997). Sin embargo con la utilización de técnicas de reproducción asistida, en especial durante ICSI, se facilita la fecundación a espermatozoides que, de forma natural no llevarían a cabo ese proceso. De este modo, la fecundación podría darse con espermatozoides portadores de defectos o errores que mediante fecundación natural no se darían. En concreto espermatozoides con alteraciones o daño en su ADN podrían fecundar y dar lugar a errores durante el desarrollo preimplantacional (Nasr-Esfahani et al., 2005; Sakkas et al., 1998; Tesarik, 2005), postimplantacional (Borini et al., 2006; Tesarik et al., 2004) e incluso en su desarrollo adulto (Marchetti and Wyrobek, 2005). Por todo ello, es necesario evaluar nuevos marcadores como predictores de éxito en la fecundación y durante el posterior desarrollo, entre los que destaca la integridad del ADN espermático.

4.- LA ESTRUCTURA NUCLEAR DEL ESPERMATOZOIDE Y SU PAPEL EN EL ÉXITO REPRODUCTIVO

El ADN del espermatozoide aporta la mitad del material genético a la descendencia y es necesario para la fecundación, el desarrollo del embrión y para el correcto desarrollo fetal y postnatal. Las alteraciones en el material genético espermático pueden incluir, entre otras: defectos en la maduración o condensación nuclear, deficiencias en las protaminas, fragmentación del ADN o defectos en la integridad del ADN (rotura de cadena simple o cadena doble del ADN), sustitución de sitios abásicos y aneuploidías cromosómicas en el espermatozoide (Perreault et al., 2003).

Numerosos autores han descrito que existe una correlación negativa entre las alteraciones en la organización del material genómico en el núcleo espermático y el potencial fecundante de los espermatozoides, tanto *in vivo* como *in vitro* (revisado en Spano et al., 2005; Sun et al., 1997). Estos resultados apoyan el hecho de que la estabilidad del ADN espermático, que le confiere al espermatozoide la capacidad de descondensarse en el momento adecuado en el proceso de fecundación (McCarthy and Ward, 2000), es uno de los criterios necesarios para considerar que un espermatozoide no tiene alterada su capacidad fecundante (Rodríguez-Martínez, 2007) y justifica la conveniencia de incluirlo como criterio básico de evaluación de las técnicas de criopreservación del gameto masculino, complementando a otras que se basan en características morfológicas (formas anormales, presencia de acrosoma) o de viabilidad (% de espermatozoides vivos y muertos, motilidad, capacidad fecundante *in vitro*, etc.). La escasa importancia concedida hasta ahora en los estudios de criopreservación espermático en ratón a este parámetro y su trascendencia potencial, justifican a nuestro entender la necesidad de una revisión específica.

4.1.- ESTRUCTURA DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA

La cromatina espermática se diferencia de la cromatina de las células somáticas en su estructura y composición. Se encuentra fuertemente compactada debido a las asociaciones entre el ADN, la matriz nuclear y las nucleoproteínas (Ward and Zalensky, 1996); es aproximadamente unas seis veces más compacta que la cromatina de las células somáticas (Sakkas et al., 1999), y se organiza en bucles de menor tamaño que los de estas células. Las principales diferencias en la compactación de la cromatina espermática y de las células somáticas se representan gráficamente en la Fig. 1. Hud *et al.* (1993,1994) demostraron que la unidad básica de organización del ADN espermático es una estructura toroidal de protaminas unidas al ADN que contiene aproximadamente 50 Kb de ADN por cada unidad (Hud et al., 1993; Hud et al., 1994). Ward et al. (1989) demostraron que estas unidades toroidales están organizadas en dominios de bucles, de unos 50 Kb, que están anclados a la matriz nuclear proteica (Ward et al., 1989). Dichos bucles se compactan por la acción de las protaminas intercaladas, las cuales estabilizan rígidamente la estructura a través de la formación de puentes disulfuro entre ellas. Las protaminas son proteínas características de las células espermáticas que reemplazan, durante la maduración de los espermatozoides, a la mayoría de las proteínas estructurales conocidas como histonas (Ward and Coffey, 1989; Ward and Coffey, 1991). Durante la espermiogénesis, se produce la remodelación de la cromatina, produciéndose un empaquetamiento de la misma (Ward and Coffey, 1991), las histonas se sustituyen por proteínas de transición, y éstas, a su vez, por protaminas mediante la actividad de nucleasas endógenas y ligasas (McPherson and Longo, 1993a; McPherson and Longo, 1992; McPherson and Longo, 1993b). Las protaminas son ricas en grupos tiol; existen dos clases de protaminas en el ratón y en otros mamíferos, protaminas 1 y 2. Durante la reorganización de la cromatina, se forman fragmentos de la cadena de ADN de pequeño

tamaño, endógenos y temporales (McPherson and Longo, 1993b). Aunque el proceso de formación y reparación no se conoce con exactitud (Marcon and Boissonneault, 2004), McPherson y Longo (1993) postularon que la ADN topoisomerasa II es la endonucleasa responsable de crear y ligar los fragmentos de ADN durante la espermiogénesis y la función de estos fragmentos parece ser la eliminación del superenrollamiento del ADN durante su condensación (Henkel et al., 2004; Sakkas et al., 1999). La estructura nuclear espermática protege la integridad genómica durante el transporte del genoma paterno a través del tracto reproductor masculino y femenino, evitando que el genoma espermático sea dañado por condiciones estresantes como la oxidación o una elevación excesiva de la temperatura. La protección que confiere esta estructura compensa de alguna forma la incapacidad de los espermatozoides de reparar su ADN.

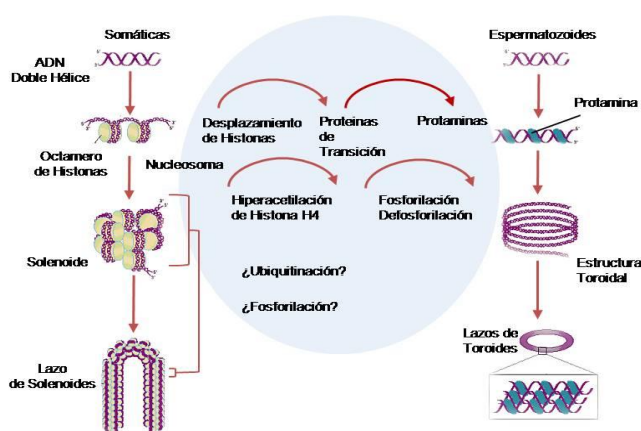


Fig. 1 Modelo de compactación de la cromatina en las células somáticas (izquierda) y en los espermatozoides de mamífero (derecha) (Modificado de Braun *et al.* 2001).

4.2.- FACTORES IMPLICADOS EN EL DAÑO NUCLEAR ESPERMÁTICO

Existen numerosos factores, tanto intrínsecos o inherentes al proceso de desarrollo espermático como extrínsecos o derivados de los procedimientos que favorecen la aparición de daño sobre el ADN espermático. Desde el punto de vista de los factores intrínsecos, se han propuesto cuatro mecanismos, que pueden comprometer o dañar la cromatina espermática: la incorrecta compactación de la cromatina, la apoptosis defectuosa, el estrés oxidativo y las lesiones genéticas (revisado en Agarwal and Said, 2003; Lewis and Aitken, 2005; Sharma et al., 2004). Como factores extrínsecos, los procesos de criopreservación y conservación a medio y corto plazo, han demostrado tener influencia sobre el parámetro calidad del ADN espermático. A continuación, se detallan estos factores.

4.2.1. FACTORES INTRÍNSECOS.

4.2.1.1.- COMPACTACIÓN INCORRECTA DE LA CROMATINA

La compactación de la cromatina se refiere a la estructura, altamente compleja y específica, en la que se organiza el ADN nuclear espermático para poder transmitir correctamente la información genética. Aunque los defectos pueden originarse en cualquiera de los cuatro niveles de empaquetamiento, los problemas más comunes surgen durante la formación de los dominios de bucles y en el reemplazo de las histonas por protaminas (Gorczyca et al., 1993; Manicardi et al., 1998; Sailer et al., 1995).

4.2.1.2.- APOPTOSIS DEFECTUOSA

La muerte celular programada o apoptosis ocurre durante las tres fases de la espermatogénesis, pero la maquinaria celular que permite que estas células sufran una apoptosis completa y sean eliminadas, se pierde progresivamente durante la espermatogénesis. Por esta razón, durante los estados avanzados de diferenciación de las células germinales los espermatozoides defectuosos no pueden ser eliminados (Braun, 1998). Se cree que la apoptosis tiene dos funciones principales durante el proceso de la espermatogénesis normal (Seli et al., 2004; Sharma, 2004; Spano et al., 2005); la primera función es limitar la población de células germinales a números que puedan ser tolerados por las células de Sertoli, y eliminar los espermatozoides defectuosos. El fallo en la eliminación de las células germinales anormales durante la espermatogénesis puede ser la causa de la presencia en el eyaculado de espermatozoides con su ADN dañado (Sakkas et al., 1999; Sakkas et al., 2002).

4.2.1.3.- ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo en el tracto reproductor masculino se produce como consecuencia de un exceso de los radicales libres de oxígeno (RLO) que están presentes en los fluidos del tracto genital masculino (revisado en Tesarik et al., 2006), como consecuencia de un desajuste entre la producción de RLO y la capacidad antioxidante (Wang et al., 2003). Los espermatozoides son particularmente susceptibles al estrés oxidativo debido al alto contenido en ácidos grasos insaturados en sus membranas, así como debido al limitado almacenamiento de enzimas antioxidantes (Baker and Aitken, 2005). Su susceptibilidad al estrés oxidativo se ve incrementada cuando la compactación de la cromatina es incorrecta, lo que causa un mayor daño al genoma (Aitken and Krausz, 2001). En condiciones fisiológicas, este tipo de daño no es preocupante ya que se produce daño peroxidativo de la membrana de los espermatozoides que asegura que los espermatozoides afectados no puedan participar en la fecundación (Aitken and Krausz, 2001). Sin embargo, con el empleo de las técnicas de reproducción asistida estos

espermatozoides con daño en el ADN sí que pueden participar en la fecundación (Lopes et al., 1998b; Saleh et al., 2003; Twigg et al., 1998).

4.2.1.4.- ACTIVACIÓN DE CASPASAS Y NUCLEASAS

Las caspasas y endonucleasas se pueden activar en espermatozoides por factores físico-químicos. Algunos autores han sugerido que los espermatozoides maduros contienen nucleasas que pueden ser activadas bajo ciertas condiciones (Maione et al., 1997; Sakkas et al., 2002; Tateno et al., 2000). Sotolongo *et al.* (2005) reportaron la existencia de endonucleasas endógenas en espermatozoides maduros de ratón, hámster y seres humanos, que digerían el ADN espermático en fragmentos de aproximadamente 50 Kb. Las nucleasas endógenas pueden ser liberadas por espermatozoides con la membrana dañada (Ward and Ward, 2004), como ocurriría por ejemplo en caso de espermatozoides muertos durante el proceso de criopreservación o bien activadas por estímulos externos como la presencia de ADN exógeno (Maione et al., 1997). Esta acción puede ser evitada mediante la preincubación con inhibidores de las nucleasas como el ácido aurintricarboxílico (Zaccagnini et al., 1998). La acción de estas endonucleasas requiere la presencia de iones como Ca^{2+} o Mg^{2+} (Szczygiel et al., 2003).

Además de los mecanismos mencionados, determinadas situaciones y sustancias han sido identificadas en relación con un aumento de la fragmentación del ADN de los espermatozoides: el uso de ciertos fármacos, la contaminación atmosférica, el tabaquismo, los episodios de fiebre alta, una temperatura testicular elevada, anomalías tales como el varicocele o una edad avanzada (Enciso et al., 2006; Ji et al., 1997; Rubes et al., 2005).

4.2.2.- FACTORES EXTRÍNSECOS

No sólo el daño presente en el ADN espermático es consecuencia de un desarrollo celular anómalo durante la espermatogénesis. Con el impulso de los bancos de conservación de germoplasma y la necesidad, en general, de conservar espermatozoides (García-Vázquez et al., 2009; Hu et al., 2008; Yıldız et al., 2007) así como con la utilización de técnicas de reproducción asistida, resurge la cuestión sobre la calidad del ADN portado por estos espermatozoides que previamente se han conservado. Más allá, ante determinadas situaciones patológicas como la incapacidad de fecundar tanto *in vitro* como *in vivo*, el análisis de ADN en estas muestras ha resultado ser clave para la demostración de determinados eventos que tienen lugar sobre el material genético durante los procesos de conservación, tanto mediante congelación como por otras técnicas.

Tras los procesos de congelación y descongelación propios del manejo de muestras en bancos de recursos genéticos, se han descrito diferentes alteraciones en el espermatozoide.

En otros, se produce la externalización de residuos de fosfatidilserina en su membrana plasmática (Garcia-Vazquez et al., 2009; Hu et al., 2008; Perez-Crespo et al., 2008a; Yildiz et al., 2007), depleción del potencial mitocondrial (Bollwein et al., 2008), inhibición de la síntesis de ATP (Berlinguer et al., 2009) y por tanto baja motilidad (Baumber et al., 2005; Bollwein et al., 2008; Brum et al., 2008; Martin et al., 2004; Paasch et al., 2004). En último término, se produce una descondensación del contenido nuclear (Ahmad et al.; Gandini et al., 2006; Ward and Ward, 2004; Young et al., 2003; Zini et al., 2009; Zribi et al.)

Durante la descongelación de las muestras seminales se produce un aumento de la producción de radicales libres de oxígeno (Gandini et al., 2006; Kim et al.; Martins et al., 2007a; Thomson et al., 2009; Thomson et al.; Yildiz et al., 2007; Zini et al., 2009). En esta ocasión, la reactivación de la maquinaria mitocondrial (Baumber et al., 2005; Nishizono et al., 2004) es la causa del este estrés oxidativo. Las especies reactivas de oxígeno tienen diferentes efectos, desde la modificación de la membrana plasmática y por tanto impedimento de la fecundación (Nishizono et al., 2004) hasta la modificación de bases en el ADN espermático. Este daño será portado por el espermatozoide siendo potencialmente causa de anomalías en el desarrollo del neonato, como se verá en el siguiente apartado.

Unido a la generación de radicales libres, se produce la distorsión de la membrana plasmática del espermatozoide. Esta modificación ocasiona la extravasación de sustancias al medio que pueden afectar a la integridad y funcionalidad del espermatozoide (Perez-Crespo et al., 2008a). Se han descrito, entre otras, la existencia de enzimas con capacidad de degradación del ADN espermático (Boaz et al., 2008; Yamauchi et al., 2007a; Yamauchi et al., 2007b). Por esta razón sería posible la degradación del ADN espermático debido a la presencia de estas enzimas, como se ha descrito dentro del apartado de factores intrínsecos.

Por todo lo descrito, el daño portado por un espermatozoide conservado mediante procesos de criopreservación no tiene por qué ser debido sólo a una cuestión de su desarrollo durante la espermatogénesis y ha de observarse, convenientemente, la posibilidad de que los procesos que tienen lugar durante la conservación imposibiliten su funciones o altere alguno de los componentes, como el DNA, esenciales para la contribución del espermatozoide en su fisiología.

4.3- EL DAÑO NUCLEAR ESPERMÁTICO Y SUS EFECTOS ESPECÍFICOS EN LA FERTILIDAD Y EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Como mencionamos al inicio de esta sección, numerosos autores han correlacionado las alteraciones en el ADN espermático con fracasos reproductivos. En unos casos establecer esta correlación es más sencillo, puesto que el problema se manifiesta a nivel de los parámetros funcionales del espermatozoide o en el mismo momento de la fecundación. En otros casos, sin embargo, estas alteraciones cursan con un efecto a más largo plazo, más sutil

y por ello más difícil de reconocer, como ocurre cuando el fracaso se manifiesta durante el desarrollo embrionario, fetal o postnatal.

4.3.1.- RELACIÓN ENTRE EL DAÑO NUCLEAR ESPERMÁTICO LOS PARAMETROS ESPERMÁTICOS Y EL ÉXITO EN LA FECUNDACIÓN

Muchos autores coinciden en reconocer que hay una correlación negativa entre los parámetros de motilidad y viabilidad espermática y los índices de fragmentación del ADN en diferentes especies (Huang et al., 2005; Irvine et al., 2000; Kodama et al., 1997; Saleh et al., 2003; Tomlinson et al., 2001). En la especie humana, donde los estudios son más detallados, el daño nuclear espermático está claramente asociado con la infertilidad (Agarwal and Said, 2003; Aitken and Baker, 2004), pero un pequeño porcentaje de espermatozoides de seres humanos fértiles posee niveles detectables de daño en el ADN (Kodama et al., 1997; Spano et al., 2000; Zini et al., 2001). Esta relación entre el daño nuclear espermático y un descenso en la fertilidad también se manifiesta en los animales domésticos (Boe-Hansen et al., 2008; Fraser, 2004; Kasimanickam et al., 2006a; Kasimanickam et al., 2006b; Morrell et al., 2008).

El daño nuclear espermático no coincide siempre con otras alteraciones morfo-funcionales. Se ha señalado que cuando el estrés oxidativo es bajo provoca daño del ADN espermático, sin embargo, los espermatozoides siguen teniendo su capacidad de fecundar intacta (Aitken et al., 1998). Cuando el estrés oxidativo es elevado provoca un daño severo en el ADN espermático; los espermatozoides pierden su capacidad fecundante debido al estrés oxidativo colateral de la membrana plasmática (Aitken et al., 1998); este hecho se corrobora con los resultados de estudios clínicos que indican que el éxito de la fecundación *in vitro* se correlaciona negativamente con el nivel de daño del ADN espermático (Benchai et al., 2003; Host et al., 2000; Huang et al., 2005; Payne et al., 2005; Sun et al., 1997). Sin embargo, no se observa el mismo resultado cuando la técnica empleada es la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). ICSI es una técnica de reproducción asistida que consiste en la inyección de un espermatozoide en el interior del ovocito utilizando un micromanipulador bajo visión microscópica; con esta técnica, se consigue una fecundación exitosa, incluso con espermatozoides que presentan un cierto daño en su ADN (Aitken and Baker, 2004; Host et al., 2000; Lopes et al., 1998a; Sun et al., 1997; Twigg et al., 1998; Zini et al., 2005). Estos resultados son probablemente debidos a que con la utilización de ICSI, la fecundación no depende de la competencia funcional de los espermatozoides en términos de su habilidad para capacitarse, llevar a cabo la reacción acrosómica, penetrar la zona pelúcida o fusionarse con la membrana vitelina del ovocito. Con la técnica de ICSI se sobrepasa los mecanismos de selección espermática natural y se incrementan las posibilidades de que un espermatozoide con su ADN dañado pueda fecundar un ovocito (Aitken, 1999; Fischer et al., 2003).

4.3.2.- RELACIÓN ENTRE EL DAÑO NUCLEAR ESPERMÁTICO Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO PREIMPLANTACIONAL

Los ovocitos y los embriones en estadio preimplantacional tienen capacidad para reparar las anomalías en el ADN de los espermatozoides (Ahmadi and Ng, 1999b; Genesca et al., 1992; Matsuda et al., 1989; Shimura et al., 2002a; Shimura et al., 2002b). En consecuencia, el efecto biológico del daño nuclear de los espermatozoides depende del grado de daño presente y de la capacidad del ovocito para repararlo. La fecundación de ovocitos en metafase II con espermatozoides con alteraciones del ADN podría conducir a alteraciones en el desarrollo del embrión, fallos en la implantación, o a un aumento en la tasa de abortos (Evenson, 1999; Genesca et al., 1992; Sun et al., 1997; Twigg et al., 1998). Los ovocitos maduros, con los mecanismos de reparación de ADN intactos, tienen la capacidad de reparar un daño moderado de ADN en los espermatozoides (Matsuda et al., 1989). Sin embargo, ovocitos inmaduros, ovocitos envejecidos o aquellos cuyos mecanismos de reparación no funcionen de forma adecuada (p.ej. los ovocitos de mujeres de edad avanzada) o que hayan sido dañados por factores tóxicos endógenos (p.ej. radicales libres) o exógenos (p.ej. tabaco, radiación, tóxicos ambientales) pueden no ser capaces de reparar este daño (Menezo, 2006; Zheng et al., 2005). Además, se ha descrito la existencia de un valor limitante de fragmentación del ADN espermático, a partir del cual el daño del ADN no puede ser reparado (Ahmadi and Ng, 1999b).

La influencia del daño nuclear espermático en el desarrollo embrionario y fetal es un asunto prioritario en las líneas de investigación trazadas con el fin de evaluar la seguridad de las técnicas de reproducción asistida. Mientras que existe controversia acerca del impacto de la fragmentación del ADN en la tasa de fecundación (Benchabib et al., 2003; Hammadeh et al., 2006; Host et al., 2000; Huang et al., 2005; Lopes et al., 1998a; Saleh et al., 2003; Sun et al., 1997; Tomlinson et al., 2001; Twigg et al., 1998), numerosos estudios afirman que la fragmentación del ADN espermático tiene un impacto negativo sobre el desarrollo embrionario y la tasa de gestación (Ahmadi and Ng, 1999a; Barroso et al., 2000; Borini et al., 2006; Bungum et al., 2004; Carrell et al., 2003a; Carrell et al., 2003b; Fatehi et al., 2006; Larson et al., 2000; Sakkas et al., 1998). Las alteraciones del desarrollo embrionario están presuntamente asociadas con la transcripción defectuosa de los genes dañados en el genoma paterno (Tesarik et al., 2004). En los ciclos de reproducción asistida, en los que se llevan a cabo las técnicas de FIV o ICSI, existe una correlación negativa entre el desarrollo preimplantacional y el daño nuclear espermático evaluado por diversas metodologías como *In situ* nick translation (Sakkas et al., 1998), ensayo Cometa (Morris et al., 2002), TUNEL (Ahmadi and Ng, 1999a; Sun et al., 1997) y SCSA (Bungum et al., 2004; Saleh et al., 2003; Virro et al., 2004). Algunos trabajos han señalado que la fragmentación del ADN espermático no siempre va asociada a una alteración de la morfología embrionaria (Benchabib et al., 2003; Tesarik et al., 2004) y, sin embargo, causa efectos negativos sobre el desarrollo fetal (Tesarik et al., 2004). Al igual que el daño nuclear espermático dificulta el desarrollo embrionario, la implantación embrionaria también se ve

afectada negativamente (Borini et al., 2006; Moskovtsev et al., 2005); incluso en los ciclos de inseminación artificial en seres humanos, la fragmentación del ADN se correlaciona negativamente con la tasa de implantación (Duran et al., 2002).

4.3.3.- RELACIÓN ENTRE EL DAÑO NUCLEAR ESPERMÁTICO Y LA SALUD DE LOS INDIVIDUOS DE LA DESCENDENCIA

A pesar de que los espermatozoides con anomalías en el ADN muestren una reducida capacidad fecundante y su presencia se asocie a una disminución en la tasa de gestación, existe la posibilidad de que los espermatozoides con un elevado grado de daño nuclear sean capaces de fecundar y dar lugar a individuos viables cuando se utilizan técnicas como ICSI, donde se eliminan las barreras de la selección natural (Twigg *et al.* 1998; Gandini *et al.* 2004). Cuando se dan estas circunstancias, se ha propuesto que se puede observar en la descendencia un aumento significativo de la incidencia de ciertas enfermedades, tales como la propia infertilidad (Aitken y Krausz, 2001; Silber y Repping, 2002), cáncer infantil (Sorna *et al.* 1997; Ji *et al.* 1997; Zenzes, 1999; Arnon, 2001; Marchetti and Wyrobeck, 2005) o ciertas enfermedades de impronta genómica anormal (Cox *et al.* 2002).

4.4.- METODOLOGÍAS PARA LA DETECCIÓN DE ANOMALÍAS EN LA CROMATINA ESPERMÁTICA

En los últimos años, uno de los objetivos de muchos trabajos de investigación y de las clínicas de reproducción asistida es poder determinar el grado de fragmentación del ADN de los espermatozoides en los animales y en el ser humano mediante una tecnología rápida, eficaz y de coste asequible para poder utilizar este parámetro, junto con los parámetros clásicos, en la determinación rutinaria de la calidad seminal. Además, se han propuesto establecer para cada una de las especies, cuál es el grado de fragmentación del ADN de los espermatozoides a partir del cual la fertilidad del individuo puede verse afectada. Existen dos estrategias para la detección del daño nuclear en las muestras espermáticas. Por una parte se agrupan los métodos que miden de forma indirecta la fragmentación del ADN; se incluyen aquellas tecnologías que miden la capacidad diferencial que presenta la cromatina para desnaturalizarse frente a determinados tratamientos. En este grupo se incluyen técnicas tales como el análisis de la estructura cromatínica del espermatozoide (Sperm Chromatin Structure Assay, SCSA) (Evenson et al., 1999), el test de dispersión de la cromatina del espermatozoide (Sperm Chromatin Dispersión, SCD) (Fernandez et al., 2005a; Fernandez et al., 2003), el test CMA3 que detecta espermatozoides que tienen un nivel deficiente de empaquetamiento en su cromatina (Manicardi et al., 1995) , y la tinción de ADN con naranja de acridina que detecta el grado de desnaturalización del ADN (Tejada et al., 1984). En segundo lugar se agrupan las metodologías que miden de forma directa el daño en el ADN; se incluyen aquellas metodologías encaminadas a marcar las roturas en la cadena de ADN, tanto de cadena sencilla como de cadena doble, incorporando marcadores en ciertos extremos de la rotura. Dentro de

este grupo, se pueden incluir, como de especial importancia, el uso de procesos enzimáticos para la incorporación *in situ* de nucleótidos marcados, tales como el marcaje terminal con dUTP (Terminal dUTP Nick-End Labelling, TUNEL) (Gorczyca et al., 1993), la detección mediante hibridación *in situ* de roturas del ADN (DNA Breakage Detection-Fluorescence *In Situ* Hybridization, DBD-FISH) (Fernandez et al., 2000), o el marcaje interno mediante desplazamiento de mella (*In Situ* Nick Translation, ISNT) (Gorczyca et al., 1993). Dentro de los métodos que cuantifican de forma directa el daño del ADN se encuentra también el ensayo “COMET” o Cometa en el que se realiza una electroforesis de células individuales para el análisis del ADN; este ensayo se conoce en inglés como Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) (Singh et al., 1988). Las principales técnicas empleadas para la detección de anomalías en la cromatina espermática se representan en la Tabla 1.

4.4.1.- ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA DEL ESPERMATOZOIDE (SCSA)

La técnica desarrollada por Evenson *et al.* (1980) hace más de 25 años, se viene considerando como el referente para el análisis de la fragmentación del ADN en el espermatozoide (Evenson et al., 1980). La técnica SCSA se basa en un principio por el cual los espermatozoides con cromatina anormal presentan una mayor susceptibilidad *in situ* a desnaturalizarse parcialmente tras aplicar un tratamiento con calor o una solución ácida (Evenson et al., 2002). La segunda parte de la metodología se fundamenta en las características metacromáticas de la naranja de acridina. Este fluorocromo tiene la capacidad de intercalarse entre las dos cadenas de ADN como un monómero, que al ser excitado emite en verde, pero que presenta emisión en color rojo-anaranjado si se incorpora al ADN de cadena sencilla.

Las células así teñidas se someten a citometría de flujo para discernir entre ambos tipos de color. Su aplicación está relativamente extendida en humanos y también se ha ensayado para el estudio de la fragmentación del ADN en muestras de semen procedentes de animales de granja tales como ganado porcino y bovino (Boe-Hansen et al., 2005). Esa técnica es la más aceptada para establecer correlaciones entre fragmentación del ADN y fertilidad de un individuo. El grupo del Dr. Evenson ha establecido que individuos con un índice de fragmentación en su ADN de alrededor de un 30% o superior, presentaría problemas de fertilidad (Evenson, 1999). El inconveniente que tiene esta técnica es que no es accesible a la mayoría de los laboratorios, ya que requiere la utilización de la citometría de flujo.

4.4.2.- ENSAYO SCGE ó COMET

El ensayo Cometa se basa en la aplicación de un tratamiento de descondensación del ADN del espermatozoide en el seno de un gel y, posteriormente, su sometimiento a la acción de un campo eléctrico en el que las moléculas de ADN se desplazan y generan una imagen en

forma de cometa. La metodología básica consiste en incluir una muestra de espermatozoides en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos y someterlo a una solución de lisis que contenga un agente reductor de los grupos sulfidilo que se encuentran en las protaminas del espermatozoide, se utiliza por ejemplo DTT (dithiothreitol). Tras la electroforesis, el microgel se tiñe con sondas fluorescentes tipo DAPI (4,6 diamino-2-fenilindol), IP (Ioduro de Propidio) o SYBR-GREEN. Aquellos espermatozoides con su ADN íntegro no generan o sólo producen imágenes de discretas colas de cometa, mientras que aquellos núcleos que tienen su ADN dañado muestran un claro desplazamiento de los múltiples fragmentos de ADN (Singh et al., 1988).

El ensayo de COMET alcalino permite detectar roturas de cadena doble y cadena sencilla, mientras que el ensayo COMET neutro permite detectar sólo roturas de cadena doble. Al igual que ocurre con otras pruebas, esta técnica se emplea principalmente en investigación, pero tiene la ventaja de que se puede adaptar de forma sencilla para el análisis de muestras de semen de cualquier especie (Fraser, 2004). El mayor inconveniente de este ensayo es que requiere un material de uso no común en un laboratorio de andrología, como son fuentes de electroforesis y para la interpretación de los resultados se requiere un observador con experiencia o bien un software específico para que la prueba tenga cierta objetividad.

4.4.3.- ENSAYO TUNEL

El ensayo TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyUridine-Nick End Labeling) se basa en el principio por el que el enzima desoxinucleotidil transferasa Terminal (TdT) incorpora dUTP (desoxiuridina trifosfato) en roturas de cadenas dobles o simples del ADN. En concreto, en el ensayo se incorpora desoxiuridina biotinilada o marcada con un fluorocromo al 3'OH del ADN. A través de técnicas de fluorescencia o de inmunofluorescencia se identifican los espermatozoides con el ADN dañado. Teóricamente, la señal de marcado obtenida por cada espermatozoide, se incrementaría de acuerdo con el número de roturas que presente la cadena de ADN (Lopes et al., 1998b). Los espermatozoides con ADN fragmentado (múltiples 3'OH terminales) se tiñen con una fluorescencia intensa (Gorczyca et al., 1993). La fluorescencia puede detectarse tanto por citometría de flujo como a través de microscopía de fluorescencia. (Lopes et al., 1998b). El ensayo también puede analizarse en microscopio de campo claro utilizando complejos como el de avidina-biotina-peroxidasa. El ensayo TUNEL es uno de los más utilizados para medir las anomalías del ADN. En varios estudios se ha demostrado una correlación inversa entre el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado detectados mediante TUNEL y la concentración, motilidad y morfología de los espermatozoides presentes en el eyaculado (Sun et al., 1997). También se ha señalado su utilidad como herramienta en el pronóstico del éxito de las técnicas de reproducción asistida (Benchai et al., 2003; Muratori et al., 2003; Sun et al., 1997). Su principal uso se restringe al campo de la investigación y todavía no se ha expandido en la rutina clínica ya que requiere un equipo sofisticado para su análisis y personal especializado.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Tabla 1 Técnicas más comunes utilizadas para la detección de anomalías en la cromatina espermática: principio de la técnica, tipo de daño evaluado y método común de detección

Técnica	Principio	Tipo de daño detectado	Método común de detección
Análisis de la estructura de la cromatina del espermatozoide (SCSA)	Susceptibilidad de la cromatina espermática a la desnaturalización ácida	Compactación y daño en la cromatina espermática	Citometría de flujo
COMET	Inmovilización de espermatozoides en microgel de agarosa. Aplicación de solución con agentes reductores. Migración del ADN fragmentado fuera de la cabeza espermática tras electroforesis	Presencia de roturas en la cadena de ADN	Microscopio de fluorescencia
TUNEL	Marcaje de los extremos 3-OH' libres por la incorporación mediante la enzima TdT de nucleótidos marcados	Presencia de roturas en el ADN de cadena simple y doble	Citometría de flujo/Microscopio de fluorescencia
Sperm Chromatin Dispersion Test (SCD)	Evaluación de la presencia y características de los halos formados tras someter a los espermatozoides a una desnaturalización ácida	Compactación de la cromatina	Microscopio de fluorescencia y microscopio de campo claro
In Situ Nick Translation (ISNT)	Incorporación mediante la enzima ADN polimerasa de moléculas de dUTP marcado en los extremos de las roturas del ADN	Presencia de roturas en el ADN de cadena simple	Citometría de flujo/Microscopio de fluorescencia
DBD-FISH	Hibridación, con una sonda de ADN marcado, de las roturas generadas tras someter al ADN a una solución alcalina	Roturas en el ADN. Daño in situ en secuencias específicas del ADN	Microscopio de fluorescencia
Naranja de acridina	Diferenciación entre ADN de cadena sencilla o cadena doble	Compactación de la cromatina	Citometría de flujo/Microscopio de fluorescencia

4.4.4.- TEST DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA (SCD)

La idea base del test SCD reside en producir una descondensación diferencial de la cromatina entre aquellos espermatozoides que presentan su ADN fragmentado con respecto a aquellos que lo mantienen intacto. Se ha comprobado que, tras un tratamiento ácido previo, aquellos espermatozoides con ADN fragmentado no sueltan o ven impedida en gran medida la liberación de los bucles de ADN, mostrando halos muy reducidos o ausencia de los mismos, al contrario que los espermatozoides sin fragmentación del ADN (Fernandez et al., 2003). Valorando el tamaño de los halos de dispersión de la cromatina, mediante microscopía tanto de campo claro como de fluorescencia, es posible reconocer la presencia de fragmentación del ADN en los espermatozoides (Fernandez et al., 2005b). La principal ventaja de esta técnica es que la interpretación de los resultados no requiere la determinación de color, ni de intensidad de fluorescencia y no necesita de un equipo complejo, ni de personal especializado.

4.4.5. - ENSAYO *IN SITU* NICK TRANSLATION (ISNT)

El análisis de *in situ* nick translation (ISNT) cuantifica la incorporación de dUTP marcado (biotinilado o con marcadores fluorescentes o radioactivos) a las roturas del ADN de cadena sencilla en una reacción catalizada por la polimerasa I. El ensayo ISNT detecta los espermatozoides que contienen valores apreciables de daño endógeno en su ADN. Es una técnica de concepción similar al TUNEL; la mayor diferencia con éste radica en que, en este caso, existe una actividad enzimática exonucleasas y la incorporación de nucleótidos es mayor por utilizar la cadena de ADN complementaria como molde. Los resultados del análisis de ISNT indican la presencia de anomalías originadas durante la remodelación de la cromatina del espermatozoide (Gorczyca et al., 1993). Desde el punto de vista práctico, esta técnica tiene las mismas prestaciones e inconvenientes que la de TUNEL, pero no está disponible comercialmente para su aplicación directa sobre espermatozoides.

4.4.6. - DNA BREAKAGE DETECTION-FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION (DBD-FISH)

Se trata de una metodología relativamente reciente y que se circunscribe al campo de la investigación. Se fundamenta en la capacidad que tienen ciertas soluciones alcalinas de producir una desnaturalización del ADN a partir de los extremos de roturas de doble cadena o de cadena sencilla, o bien lugares sensibles al álcali. Después de la desnaturalización y extracción de las protaminas utilizando una solución de lisis, el ADN generado de cadena sencilla, puede hibridarse con una sonda de ADN. Cuantas más roturas existan en dicha cadena, mayor será el nivel de marcado que se obtenga en el núcleo (Fernandez et al., 2000). Al igual que las técnicas de TUNEL o ISNT, la técnica de DBD-FISH no se puede considerar de aplicación rutinaria. Desde el punto de vista de la investigación, tiene mucho interés, ya que es la única técnica disponible que nos permite evaluar daño de célula a célula, *in situ*, en secuencias específicas del ADN (Fernandez and Gosalvez, 2002).

4.4.7.- TEST DE NARANJA DE ACRIDINA

Utilizando las propiedades metacromáticas de la naranja de acridina, algunos investigadores han aplicado el mismo principio que el utilizado en el SCSA para visualizar los espermatozoides con ADN fragmentado empleando microscopía de fluorescencia (Gopalkrishnan et al., 1999; Tejada et al., 1984). El mayor problema de esta técnica es el componente de la subjetividad del observador en el momento de discriminar entre la emisión del color verde y del naranja de este fluorocromo, dado que existe toda una serie de colores intermedios que probablemente se relacionan con una sensibilidad diferencial a la desnaturalización de los distintos espermatozoides. Además los resultados no parecen muy reproducibles, ya que varían con el tiempo.

5. TRANSPORTE Y SELECCIÓN ESPERMÁTICA

Habiendo expuesto la importancia de la integridad del ADN espermático, surge una pregunta evidente, ésta es sí, de forma natural, los espermatozoides que fecundan el ovocito están sometidos a algún tipo de selección espermática en el útero materno en base a esta característica para garantizar el éxito de los más aptos. Las técnicas estándar de contrastación espermática que se utilizan para determinar la calidad de un semental o de una técnica de criopreservación se basan en una evaluación funcional espermática (motilidad, integridad de membrana, etc.) Básicamente evalúan las características esenciales que deben de mostrar los espermatozoides en su ascenso por el tracto femenino y su interacción con el ovocito, pero en ningún caso determinan parámetros moleculares como la fragmentación del ADN. En esta sección revisaremos el sistema de transporte del espermatozoides en el tracto femenino y los mecanismos de selección que se ejercen. En combinación con los modelos de inducción de fragmentación de ADN de la sección siguiente, nos darán las premisas para plantear un estudio que permita aclarar si existe alguna selección natural en base a la calidad del ADN espermático y se correlaciona con los parámetros funcionales que se determinan de forma sistemática. Con esto podremos sopesar la conveniencia de incluir este nuevo parámetro en la evaluación sistemática del espermatozoides o si solo es relevante cuando se utilizan técnicas de reproducción asistida.

5.1.- COMPORTAMIENTO EN LA COPULA E INSEMINACIÓN

En la mayoría de las especies domesticas, la llegada del espermatozoides al tracto genital está asociada cronológicamente con el tiempo de la ovulación, bien porque ésta es inducida por el coito (gata, coneja o llama), porque la ovulación ocurre durante el estro cuando la hembra esta receptiva al macho permitiendo la cubrición (perra, yegua, oveja, cerda, rata y hámster) o porque la ovulación ocurre en momentos cercanos tras el estro (bovino). Entre mamíferos, el ejemplo más extremo de tiempo prolongado entre coito y ovulación es el murciélago hibernador, que puede llegar a más de 6-7 meses (Racey et al., 1987).

El sitio donde se deposita el semen define las barreras anatómicas que el espermatozoide debe superar durante el tránsito a los oviductos. Estas barreras restringen el paso del espermatozoide, establecen un gradiente en el número de espermatozoides a lo largo del tracto uterino y puede funcionar como reservorio espermático (Hunter and Nichol, 1988; Overstreet and Cooper, 1978b). El establecimiento de un gradiente de espermatozoides parece reducir el riesgo de poliespermia (Hunter and Nichol, 1988). Para especies con deposición uterina de semen (ej. perro, caballo, llama y roedores de laboratorio) la unión útero-tubal (UTJ) es la primera barrera física hacia el oviducto, teniendo lugar un gradiente de espermatozoides muy acusado en sentido craneal hacia esta barrera (Hunter and Nichol, 1988). Para especies con inseminación vaginal (rumiantes, primates, lagomorfos, etc.) la primera barrera es el cérvix, sirviendo la UTJ como barrera adicional para restringir el acceso a los oviductos. En rumiantes y primates, el canal cervical es ocupado con moco y las características biofísicas de la secreción están afectadas por el estado endocrino de la hembra. Esta diversidad del proceso biológico permite anticipar que difícilmente existirá un proceso único de selección

5.2.- DISTRIBUCIÓN DEL ESPERMA

La distribución del espermatozoide dentro del tracto reproductivo ha sido descrita clásicamente en diferentes fases, definidas por su relación en el tiempo con el momento de la inseminación y la contribución pasiva del movimiento causado por el movimiento de las contracciones de las vísceras dentro del tracto reproductivo (Overstreet and Cooper, 1978a; Overstreet and Cooper, 1978b). La fase rápida de transporte es un evento pericoital, caracterizada por la presencia de espermatozoides en el oviducto a los pocos minutos de efectuarse la inseminación o cubrición por parte del macho (Overstreet and Cooper, 1978a).

Esta tasa de transporte es mucho más rápida que la velocidad desarrollada por el espermatozoide nadando *deprisa*; por esta razón, se le atribuye cierto efecto a la contractilidad muscular del tracto reproductivo sobre la velocidad final de la distribución del espermatozoide en el tracto reproductivo. Esa contractilidad parece ser debida a cambios en la presión intraluminal (Drobnis and Overstreet, 1992). Sin embargo los espermatozoides transportados de esta forma no contribuyen a la población fértil del oviducto, pues en un elevado porcentaje están moribundos, muertos o tienen alterada su membrana (Overstreet and Cooper, 1978a). La fase de transporte es seguida de una prolongada fase de migración (Overstreet and Cooper, 1978b) durante la cual la distribución del espermatozoide prosigue y es cuando se establece el reservorio de espermatozoides previo a la fecundación. También es en esta fase cuando el espermatozoide competente llega al oviducto. Este recorrido tiene lugar en 1-2 h en el cerdo (Hunter and Nichol, 1988), 1,5-6 h en el conejo (Overstreet and Cooper, 1978b) y entre 6-8 h en oveja y ternera (Hunter and Nichol, 1988).

5.2.1.- MOTILIDAD ESPERMÁTICA Y TRANSPORTE ESPERMÁTICO

La motilidad espermática se acepta como una manifestación de competencia funcional, pues es el resultado de la acción del flagelo. La contribución de la motilidad a la distribución del espermatozoide a lo largo del tracto reproductivo femenino es más evidente durante la larga fase de transporte. Dentro del tracto femenino, la motilidad es modulada por fuerzas dinámicas impuestas al flagelo, por contracciones espaciales, características de la superficie del epitelio y las características reológicas de las secreciones (Katz et al., 1989). La motilidad es necesaria para que el espermatozoide pueda colonizar y cruzar el cérvix (Overstreet and Cooper, 1979) y el moco cervical (Katz et al., 1990) y podría ser también requisito para atravesar la unión útero-tubal. De hecho se ha descrito como en un modelo *in vitro* en presencia de contracciones musculares, los espermatozoides motiles de rata emergen desde el extremo final del corte oviductal de la UTJ, mientras que los espermatozoides no-motiles que quedan en el fluido uterino, (Gaddum-Rosse, 1981) no lo hacen.

Sin embargo la motilidad tiene también características cualitativas importantes. Así pues, los espermatozoides que se mueven progresivamente son los más propensos a penetrar en la microestructura del moco cervical (Katz et al., 1989) o cruzar más satisfactoriamente la unión UT (Gaddum-Rosse, 1981). Sin embargo, el transporte a través de la UT está impedido significativamente para aquellos espermatozoides que muestran un tipo de motilidad (hipermotilidad) vigorosa pero no progresiva. Este hecho explica fracasos de estrategias donde este tipo de motilidad es inducida por capacitación *in vitro* (hámster; (Shalgi et al., 1992) o por preincubación de espermatozoides epididimarios en presencia de calcio (ratón; (Olds-Clarke and Wivell, 1992) previo a la inseminación artificial.

La motilidad no asegura una migración con éxito a través del útero y por esa razón no puede ser el único factor a considerar en la valoración de la capacidad fecundante o al que se pueda atribuir una hipotética selección por parte del tracto genital de la hembra. Las causas del fracaso de espermatozoides móviles podrían encontrarse al nivel de la interacción entre espermatozoide-epitelio. Estudios recientes con ratones transgénicos han demostrado que alterando las proteínas de la superficie espermática puede comprometerse la migración del espermatozoide que de otra manera sería normal. La fertilina y la isoenzima testicular de la enzima convertidora de angiotensinogeno (ACE) son algunas de esas proteínas de superficie. Los espermatozoides recuperados del útero de hembras cruzadas con machos carentes de fertilina beta (Cho et al., 1998) o el gen de ACE en testículo (Hagaman et al., 1998) mostraron motilidad normal, capacitación y reacción acrosómica *in vitro*, pero, *in vivo*, eran incapaces de transportarse a los oviductos.

Los resultados de estudios independientes sugieren que las proteínas de superficie son elementos funcionales muy importantes en el proceso de transporte subrayando el significado de la interacción espermatozoide-epitelio como una pieza clave de la migración espermática. El

hecho de que los espermatozoides normalmente se adhieren intermitentemente al epitelio del útero, collicus, UT e istmo durante el tránsito a través del tracto femenino. Suarez (1987) no hace más que abrir la posibilidad a otros posibles mecanismos de selección espermática no basados en la motilidad que merecen ser explorados.

5.2.2.- MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA Y TRANSPORTE ESPERMÁTICO

Existe una selección que hace a los espermatozoides morfológicamente anormales ser funcionalmente menos competentes, por ejemplo les incapacita para nadar a través del moco cervical. Esta exclusión en el cérvix podría ser debido a una motilidad menor y/o anomalías en la superficie (Katz et al., 1989). En bovino, hay una presencia residual de espermatozoides morfológicamente anormales en el istmo oviductal y UT unas 12 h después de la inseminación intrauterina. Habiendo traspasado la barrera cervical, al ser depositados por inseminación artificial, sin embargo su bajo número en estas zonas anatómicas indica que el transporte de este tipo de espermatozoides en la zona anterior del tracto genital está comprometido (Mitchell et al., 1985). De la misma manera muy pocos espermatozoides con cabezas anormales fueron recuperados del oviducto o la UT de vacas 2 h después de la inseminación intrauterina con semen cuya proporción de cabezas anormales excedía el 40% (Larsson, 1988). Este no es un fenómeno exclusivo del vacuno. La unión útero tubal parece bloquear el paso de la mayoría de los espermatozoides de ratón que tienen anomalías severas en la cabeza (Krzanowska, 1974). En yeguas, más del 90% de los espermatozoides visualizados in situ en la UT utilizando microscopia electrónica son morfológicamente normales a pesar de que el inseminado contenía una alta concentración de espermatozoides con defectos mayores (Scott, 2000).

Estos resultados sugieren que la mayoría de espermatozoides morfológicamente anormales ni llegan a la UTJ ni desarrollan asociaciones normales con el epitelio durante el tránsito a través del tracto (Scott, 2000) de forma colectiva, estos resultados observados en una variedad amplia de especies, apoyan la idea de que la interacción funcional entre espermatozoides competentes, el fluido luminal y la superficie epitelial del tracto femenino, particularmente los sitios restringidos al espermatozoide, promueven la selección de una población normal durante el tránsito.

5.3.- RESERVORIO ESPERMÁTICO

Una interacción funcional entre espermatozoides y el tracto femenino es también crucial para el establecimiento y mantenimiento de reservorios espermáticos. Estos son necesarios cuando la monta o la inseminación preceden a la ovulación durante varias horas o días. Dentro del tracto genital femenino, las regiones que acumulan y retienen población de espermatozoides viables durante un periodo amplio de tiempo son consideradas como un reservorio espermático.

Durante la fase mantenida de transporte espermático, los espermatozoides competentes que cruzan la UTJ antes de la ovulación se acumularan en el istmo bajo y permanecerán ahí hasta el momento de la misma. En oveja (Hunter and Nichol, 1983) cerdo (Hunter, 1984) y vaca (Hunter and Wilmut, 1984), utilizando técnicas quirúrgicas de transección del istmo a diferentes intervalos de tiempo entre el coito y la ovulación, han permitido demostrar que la migración de espermatozoides competentes no progresa mas allá de los primeros 1,5-2cm del istmo bajo hasta el periodo periovulatorio. Estas evidencias demuestran que la parte baja del istmo oviductal no sólo funciona como reservorio de esperma sino que también parece regular el ascenso del espermatozoide hacia el ampulla en el momento preciso. Se puede ver así una complejidad en el proceso de migración del espermatozoide hasta el lugar de la fecundación que no sólo depende del propio espermatozoide y que está íntimamente relacionado con el entorno del tracto genital femenino, que a su vez es capaz de modularlo

5.3.1. MECANISMOS DE ALMACENAMIENTO DE ESPERMA

Existe una estrecha relación entre los espermatozoides y el epitelio luminal del tracto reproductivo femenino, que parece ser una pieza clave en la supervivencia en los reservorios. Independientemente de las especies, localización o duración del almacenaje, los espermatozoides muestran un comportamiento linear en su motilidad, con sus cabezas reorientadas y asociadas al epitelio luminal (Krishna, 1997; Krutzsch et al., 1982; Racey, 1979; Racey et al., 1987). La observación de asociaciones morfológicas similares en otras especies mamíferas podría significar un almacenaje de espermatozoides en un reservorio. Así en especies domesticas, el estudio de espermatozoides in situ tras la inseminación han demostrado interacciones similares (espermatozoide-epitelio) en regiones de acumulación espermática. En el caso del hámster los espermatozoides parecen anclarse a la mucosa con sus cabezas en forma de gancho, indicando un acoplamiento físico. Este íntimo contacto aparentemente mantiene la viabilidad espermática, puesto que el espermatozoide acoplado al epitelio mantiene actividad flagelar, sobreviviendo más que los espermatozoides que nadan a través del lumen (Smith and Yanagimachi, 1990).

Suarez (1987) observó interacciones similares entre espermatozoides vivos y el epitelio oviductal en oviductos ex vivo, proponiéndose 2 tipos de mecanismos para la retención de esperma en el istmo: adherencia en el epitelio o inmovilización. En el conejo, la motilidad esta suprimida en el esperma recuperado de la parte baja del istmo en fluido nativo, siendo este un mecanismo propuesto para la retención allí (Overstreet et al., 1980). En vaca, la combinación de un lumen estrecho y la presencia de moco puede contribuir a la retención de en el istmo bajo (Suarez et al., 1997). Estas observaciones sugieren un cambio funcional en el epitelio de los sitios de almacenaje que podría regular no sólo el anclaje y liberación de los espermatozoides, sino el mantenimiento de su capacidad fecundante. En este sentido (Dobrinski et al., 1996) se ha postulado que los bajos niveles de calcio intracelular encontrados

en espermatozoides anclados a células oviductales previenen la capacitación prematura y reacción acrosómica durante el almacenaje.

5.3.2.- ASCENSO DE ESPERMATOZOIDES COMPETENTES HACIA EL SITIO DE FECUNDACIÓN

La competencia para fecundar se consigue después de un periodo de residencia dentro del tracto femenino. Los cambios funcionales en la fisiología de la célula espermática, denominada capacitación son inducidos o facilitados por la interacción entre los fluidos luminales y la superficie del epitelio durante el transito, y es suficiente para activar la reacción del acrosoma, penetrar la zona pelúcida y fusionarse con el oolema (Yanagimachi, 1994). Entre los cambios asociados a la capacitación, destaca la hiperactivación, caracterizada por un vigoroso movimiento asimétrico del flagelo (Yanagimachi, 1994). La motilidad de tipo hiperactivo genera fuerzas que son suficientes para activar al espermatozoide y fomentar la relajación desde el lugar de almacenamiento y penetrar al ovocito (Katz et al., 1989). En rumiantes y primates, la capacitación es iniciada en el cérvix con la eliminación de la superficie del espermatozoide de ciertas proteínas como consecuencia de su avance a través del moco cervical (Drobnis and Overstreet, 1992). Las etapas finales de capacitación parecen completarse en el istmo bajo (Smith and Yanagimachi, 1990). Existe una relación temporal entre la re-entrada del espermatozoide en motilidad progresiva, su progreso hacia el ámpula en el oviducto y la ovulación. Esta coordinación puede estar regulada por cambios hormonales que ocurren en el momento de la ovulación (Hunter and Nichol, 1988). La liberación de espermatozoides del reservorio del istmo está asociado con capacitación y el desarrollo de motilidad (Overstreet and Cooper, 1979). El progreso dentro de los espacios confinados del oviducto es promovido por espermatozoides que presentan hipermotilidad (Katz and Yanagimachi, 1981) lo que sugiere un papel importante de la motilidad en la migración del espermatozoide hacia el ámpula, sin menospreciar a las contracciones del oviducto (Katz and Yanagimachi, 1981).

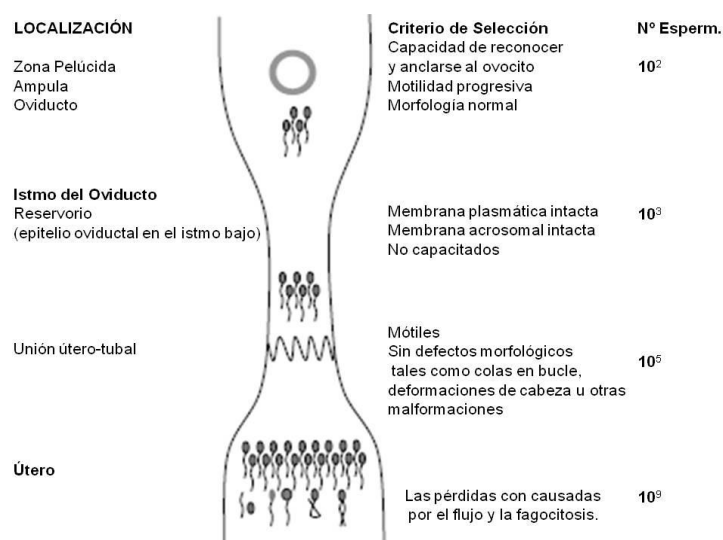


Fig. 2 Criterio de selección y número de espermatozoides en cada uno de los segmentos del tracto reproductivo.

5.5.- INTERACCION CON LA ZP

Una vez que los espermatozoides alcanzan el lugar de fecundación tienen que atravesar las barreras que presenta el ovocito, entre las que se encuentran las células del *cumulus*, la ZP y la membrana plasmática. Los espermatozoides deben estar parcialmente capacitados y no reaccionados (acrosoma intacto) para poder atravesar las células del *cumulus*. Solo los espermatozoides capacitados se mueven libremente dentro de la matriz del *cumulus*, mientras que los que no lo están se unen a la superficie pero no pueden atravesarla (Myles and Primakoff, 1997). El cúmulo es atravesado por los movimientos hiperactivos y por la actividad hialuronidasa de la proteína PH20 (Myles and Primakoff, 1997) que es capaz de hidrolizar el ácido hialurónico.

Una vez atravesadas las células del *cumulus*, el espermatozoide tiene que unirse y atravesar la ZP. Esta unión está mediada por la interacción entre moléculas con gran afinidad presentes en la superficie tanto del espermatozoide como del ovocito. Existen dos tipos de uniones. En la unión primaria, considerada relativamente especie-específica, la glicoproteína ZP3 del ratón (o equivalente en otra especie) de la zona pelúcida se une a proteínas presentes en la membrana plasmática del espermatozoide capacitado y no reaccionado. En este proceso juegan un papel importante los carbohidratos de estas glicoproteínas como son la manosa, fucosa y ácido siálico. La unión del espermatozoide con la ZP3 induce la exocitosis del acrosoma a través de dos vías de señal-activación. La primera produce la activación de la proteína de unión GTP y de la fosfolipasa C (PLC). De esta manera, se produce una elevación del calcio citoplasmático del espermatozoide. La segunda vía, estimulada también por el mismo receptor, incrementa el flujo de calcio a través de los canales tipo T (Primakoff and Myles, 2002). La unión secundaria acontece tras la reacción acrosómica. El espermatozoide reaccionado permanece unido a la ZP2 gracias al enzima proacrosina que se encuentra anclada a la membrana acrosomal interna. Sólo los espermatozoides que reconocen y se unen a las glicoproteínas de la ZP sufriendo la reacción acrosómica podrán fecundar al ovocito (Topfer-Petersen et al., 2000). Tras la reacción acrosómica y la unión secundaria a la ZP, el espermatozoide atraviesa ésta para alcanzar el espacio perivitelino. Una vez en éste, la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide localizada sobre el segmento ecuatorial se une a la membrana plasmática del ovocito, y se inicia en este punto la fusión entre ambas membranas (Moore y Bedford, 1983). El espermatozoide se incorpora en su totalidad dentro del ooplasma. La región posterior de la cabeza, junto con el flagelo, se internalizan mediante fusión de membranas, mientras que la porción anterior se engloba por fagocitosis (Gaddum-Rosse, 1985). En el proceso de fusión se conocen diferentes proteínas asociadas; éstas pertenecen a la familia ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*) y entre ellas destacan la fertilina y cirtestina (Primakoff and Myles, 2002). Estas dos proteínas se expresan en los testículos y se localizan en la cabeza del espermatozoide.

6.-DEFECTOS ESPERMÁTICOS Y MODELOS PARA SU ESTUDIO.

De una manera general se distinguen dos grandes grupos de defectos espermáticos los compensables y los no compensables. Las deficiencias que impiden el contacto del esperma con el ovocito o la penetración de éste se denominan “defectos compensables” (Saacke et al., 2000). En estos casos la utilización de un número elevado de espermatozoides por dosis puede reducir significativamente el efecto que este tipo de defectos tiene sobre la fertilidad (Amann and Hammerstedt, 2002). Así podría explicarse por qué la fertilidad se incrementa cuando el número de espermatozoides inseminados sobrepasa un umbral a partir del cual los factores limitantes en la capacidad reproductiva de la hembra comienzan a ser importantes (Fig. 2). Defectos de este tipo son los que afectan la motilidad progresiva, la integridad acrosomal, la integridad de membrana así como las anomalías severas de cabeza y cola que impiden la migración del esperma a través de los pliegues de la unión útero-tubal (Saacke et al., 2000). Sin embargo hay defectos espermáticos compensables que no pueden ser evaluados con los análisis convencionales de viabilidad espermática o morfología. Estos defectos podrían incluir eventos moleculares en la morfología del espermatozoide o cambios funcionales asociados a la capacidad de colonizar el reservorio espermático, así como la posibilidad de sufrir capacitación, reconocer el ovocito y experimentar la reacción acrosómica, ninguno de ellos ha sido evaluado bajo condiciones estandarizadas de laboratorio.

El otro grupo de defectos son los que afectan a espermatozoides aparentemente normales que pueden sufrir anomalías que no obstaculizan la fecundación pero sí afectan al cigoto o interfieren en el desarrollo posterior a la fecundación (DeJarnette et al., 1992; Setchell, 1998; Setchell et al., 1998). Estos llamados “defectos no compensables” (Saacke et al., 2000) afectarían a los parámetros reproductivos, en función del número de espermatozoides afectados por ellos que estén presentes en la dosis de inseminación (Evenson and Jost, 2000; Saacke et al., 1998). Algunos defectos no compensables han sido descritos a través del estudio de espermatozoides periféricos o accesorios (Saacke et al., 2000) es decir, aquellos capaces de llegar al ovocito y penetrarlo parcialmente (DeJarnette et al., 1992) pero incapaz de fecundarlo (Saacke et al., 2000). Entre los defectos no compensables se incluirían anomalías menores en la morfología de cabeza (Saacke et al., 2000) o estructura defectuosa de la cromatina. Este problema, como se ha descrito previamente tiene una creciente importancia por pasar desapercibida en las pruebas estándar de control de calidad seminal. Para su estudio se ha recurrido a la utilización de modelos experimentales entre los que destacan los dos siguientes:

6.1- MODELO DE ESTRÉS TÉRMICO

La función testicular normal depende de la temperatura y en la mayoría de los mamíferos los testículos se mantienen entre 2 y 8°C por debajo de la temperatura corporal, alojándose en el escroto (Ivell, 2007). En el ser humano, un aumento de la temperatura

testicular puede ocurrir como consecuencia del estilo de vida, ocupación profesional o de un desorden clínico (Mieusset et al., 2007; Mieusset et al., 1987). Con el fin de reproducir las circunstancias que provocan un aumento de la temperatura escrotal y evaluar sus consecuencias, se han diseñado una serie de modelos animales. Entre estos modelos, se encuentra el modelo en el que se expone todo el cuerpo del animal a una temperatura ambiental elevada y otro modelo en el que se somete al animal a estrés térmico escrotal local, este último, a su vez, puede ser realizado mediante la inducción de la criptorquidia, el aislamiento escrotal o el sometimiento a altas temperaturas (más de 40°C) durante un corto período de tiempo, normalmente mediante la inmersión en un baño de agua caliente. En la criptorquidia inducida de forma quirúrgica se sitúan los testículos y los epidídimos dentro de la cavidad abdominal, los testículos se ven expuestos a la temperatura corporal durante largos periodos de tiempo (Yin et al., 1997). En animales domésticos de mayor tamaño, los testículos pueden ser sometidos a estrés térmico mediante el aislamiento del escroto, una técnica realizada en moruecos, toros, caballos y cerdos (Mieusset et al., 1992). Sin embargo, introducir los testículos del animal, previamente anestesiado o sedado, en una baño de agua caliente (40-43°C) es el método más preciso de exponer los testículos a un aumento de temperatura (Setchell, 1998). Independientemente de la técnica empleada, el estrés térmico producen alteraciones en la función testicular, entre las que se incluyen, un descenso en el peso testicular, pérdida de células germinales, un incremento en la apoptosis celular (Lue et al., 2000) un descenso en la concentración, viabilidad y motilidad espermática (Banks et al., 2005; Zhu et al., 2004) y una reducción de la capacidad fecundante de los espermatozoides que da lugar a un período de infertilidad parcial o completa del animal. El efecto del estrés térmico sobre las células de la línea germinal masculina depende de la capacidad de estas células de responder al estrés, de reparar su ADN y de la posibilidad de sufrir apoptosis o necrosis (Rockett et al., 2001). Algunas de las células presentes en el testículo en el momento del estrés térmico se eliminan mediante apoptosis (Banks et al., 2005; Yin et al., 1997), muchas otras células germinales, en cambio, completan su desarrollo y dan lugar a espermatozoides móviles con daño en su ADN (Banks et al., 2005). Varios estudios han identificado que los espermatoцитos son las células más vulnerables al estrés térmico (Banks et al., 2005; De Vita et al., 1990; Paul et al., 2008b).

Los efectos del estrés térmico paterno no se reducen a un fallo en la fertilidad, tienen una proyección sobre el desarrollo embrionario. Se ha descrito: una reducción del desarrollo embrionario preimplantacional *in vitro* (Jannes et al., 1998; Setchell et al., 1998; Zhu et al., 2004) e *in vivo* (Zhu and Setchell, 2004), una reducción en el número de los embriones en estadios post-implantacionales (Yaeram et al., 2006), un descenso en el peso de los embriones en ratones (Jannes et al., 1998; Setchell et al., 1998) y un aumento del número de embriones degenerados en ovejas (Mieusset et al., 1991). También se altera el patrón de expresión de determinadas proteínas que se expresan durante el desarrollo embrionario preimplantacional

(Zhu and Maddocks, 2005), hecho que podría explicar algunas de las consecuencias negativas del estrés térmico paternal sobre el desarrollo embrionario y fetal.

6.2 - MODELO DE RADIACIÓN IONIZANTE

La radiación ionizante (RI) es un efectivo tratamiento contra el cáncer cuya diana es el ADN de las células que se dividen rápidamente. Las células germinales masculinas que sufren espermatogénesis también se encuentran en rápida división y por tanto son una diana clara para este tipo de radiación. Por este motivo, la utilización de este modelo permite evaluar de una manera clara el daño generado en el ADN del espermatozoide desde etapas muy tempranas de su desarrollo.

La principal característica de la radiación ionizante como agente que daña el ADN es la gran gama de alteraciones que ocasiona (revisado por (Frankenberg-Schwager, 1990). Estas lesiones incluyen roturas en hebras de ADN (en 1 (SSBs) o las 2 cadenas (DSBs) de ADN) así como una compleja variedad de uniones covalente entre el ADN y otras moléculas y daño en las bases que lo componen. Las lesiones mayoritarias asociadas a radiación ionizante son las DSBs. Como consecuencia, la estabilidad del genoma se compromete, manifestándose con un incremento de aberraciones cromosómicas, aneuploidía, formación de micronúcleos, mutaciones, inestabilidad de microsatélites y apoptosis (revisado en (Morgan, 2003a; Morgan, 2003b; Morgan, 2003c). La magnitud del daño infringido es dependiente de la dosis utilizada (Haines et al., 2002; Rowley et al., 1974). A dosis altas de radiación, la espermatogénesis podría tardar varios años en recuperarse o incluso no llegar a hacerlo (revisado en (Howell and Shalet, 2005; Magelssen et al., 2006).

En las células germinales irradiadas, existen mecanismos de compensación del daño que se activan e intentan reparar las alteraciones producidas con el fin de mantener la estabilidad genómica. En el caso del testículo, el 80% de sus células son germinales en diferentes estadios de desarrollo con muy diferente estructura de la cromatina (Bellve et al., 1977). De acuerdo con esta situación, estas células germinales muestran, en función del momento de desarrollo, una determinada susceptibilidad a la radiación. De todos los tipos celulares presentes en el epitelio del túbulo seminífero, las espermatogonias tipo A en fase proliferativa son más susceptibles a la radiación ionizante (Cordelli et al., 2003; Haines et al., 2002; Meistrich, 1986) que las espermatogonias A no proliferativas. La radiosensibilidad de las espermatogonias tipo B es dependiente de ciclo celular (Henriksen et al., 1996; West and Lahdetie, 2001). Cuando están en fase G2/M son radiosensibles y mueren por apoptosis, mientras que las espermatogonias tipo B en fase G1 son radioresistentes (West and Lahdetie, 2001). Joshi y colaboradores encontraron que los espermátocitos primarios y espermátidas tempranas son moderadamente radiosensibles y por tanto muestran una eficiente capacidad para reparar SSBs (Joshi et al., 1990). La sensibilidad de las espermátidas decrece conforme progresa la espermiogénesis, con un pico de sensibilidad en la mitad del proceso (Joshi et al.,

1990). Este corresponde al momento en el que justo antes las histonas son reemplazadas por proteínas de transición, previamente a la compactación de la cromatina. Los espermatozoides son mucho menos radiosensibles que las espermatogonias y espermatidas (Cordelli et al., 2003; Joshi et al., 1990).

En células somáticas, la radiación ionizante activa punto de chequeo que dirigen al arresto del ciclo celular en fase G1, S o G2/M (revisado en (Bartek et al., 2004; Bartek and Lukas, 2007; Callegari and Kelly, 2007). Este arresto del ciclo celular dota a las células de un tiempo adicional para reparar el ADN dañado antes de entrar en la siguiente fase mitótica o meiótica. West and Lahdetie (2001) encontraron que la exposición de espermatogonias tipo B en fase S resulta en un pequeño retraso en su progresión durante la meiosis (West and Lahdetie, 2001), sin embargo es sabido que el retraso es debido a la inhibición de la síntesis del ADN o al arresto en otra fase del ciclo. Se esperaría una inhibición directa de la síntesis de ADN considerando el efecto de la radiación sobre células somáticas (Hurley and Bunz, 2007; Stokes and Michael, 2004).

Curiosamente, los espermatoцитos primarios irradiados en fase G1 no sufren arresto del ciclo celular y progresan hacia fase S sin activar el punto de chequeo para ADN dañado (West and Lahdetie, 2001). Haines y sus colaboradores también encontraron que una porción de células germinales, en las cuales se había inducido un daño por radiación, sobrevivían a citado daño (Haines et al., 2002). En consecuencia, se puede encontrar ADN no reparado en espermatidas redondas, espermatozoides y células espermáticas maduras (Cordelli et al., 2003; Haines et al., 2001; Haines et al., 2002; West and Lahdetie, 2001). Haines y colaboradores encontraron que aunque el ADN dañado puede ser encontrado en células espermáticas, no es homogéneo. Pueden existir dos poblaciones portando una alta o baja proporción de daño en su ADN (Haines et al., 2002). Esta situación sugiere que una porción de células germinales con daño inducido por radiación sobrevive; estos hallazgos concuerdan con los realizados por West y Lahdetie (2001). La observación de una población heterogénea de espermatozoides dañados no es característica solamente de la radiación y ha sido observada en la exposición a mutágenos de tipo químico (Marchetti and Wyrobek, 2008). Esto sugiere que hay subpoblaciones de células germinales que son igual de sensibles o de resistentes al daño en el ADN inducido por radiación que las somáticas. Haines y colaboradores observaron daño en el ADN del espermatozoide de ratones cuatro ciclos de espermatogénesis después de la irradiación (Haines et al., 2002). Esto sugiere inestabilidad genómica dentro del testículo, responsable del daño en el espermatozoide y del bloqueo de la espermatogénesis (Haines et al., 2002).

CAPÍTULO I

**LA CAPACIDAD DE TRACTO REPRODUCTIVO FEMENINO PARA
SELECCIONAR ESPERMATOZOIDES CON ADN NO FRAGMENTADO
POST-OVULACION DEPENDE DE LA FUENTE DEL DAÑO**

RESUMEN

Antes de la ovulación, la interacción entre el espermatozoide y el tracto genital femenino, principalmente la unión útero-tubal, forma parte de los mecanismos de selección espermática en mamíferos. La monta post-ovulación no permite el anclaje de los espermatozoides a la unión útero-tubal, de forma que los mecanismos de selección actuarían únicamente durante el transporte del espermatozoide a través del tracto reproductor y/o durante la interacción del espermatozoide con la zona pelúcida (ZP) del ovocito. Con objeto de analizar si estos mecanismos de selección tienen capacidad para detectar fragmentación del ADN, se utilizaron dos modelos experimentales que inducen este tipo de daño espermático: (a) calor escrotal (42°C, 30 min) y (b) radiación ionizante a través de fuente de ^{137}Cs (4 Gy, 1,25 Gy/min). El efecto fue analizado entre 21 y 25 días posteriores al tratamiento. Para ello, se seleccionaron hembras en celo y se pusieron en cruce con machos tratados o con machos control. Una parte de ellas fueron sacrificadas 2 h post-cubrición, para analizar el esperma que consigue atravesar el tracto reproductivo. El resto fue sacrificado 14 días post cubrición con el fin de analizar el número de fetos y reabsorciones.

El efecto de la exposición a radiación ionizante quedó patente con un descenso significativo en el número de fetos vivos. Aunque el efecto de la exposición a calor térmico escrotal disminuyó el número de implantaciones totales, no tuvo influencia en el número de animales vivos. Para determinar si la integridad del ADN es una de las claves de la selección espermática en la monta post-ovulación, se analizó la fragmentación del ADN mediante COMET en a) espermatozoides obtenidos a partir de los epidídimos de ratones; b) espermatozoides recogidos de las diferentes secciones en las que se dividió el cuerno uterino (útero cercano al cérvix, útero cercano al oviducto y oviducto) y c) espermatozoides anclados a la ZP después de fecundación *in vitro* (FIV). Los valores de COMET descendieron significativamente durante el tránsito de la sección uterina cercana a la unión útero-tubal así como en los espermatozoides unidos a ZP. Sin embargo, la comparación del desarrollo embrionario tras la fecundación mediante FIV o ICSI demostró que durante la penetración de ZP tiene lugar un riguroso proceso de selección contra los espermatozoides portadores de ADN fragmentado, aunque este fenómeno de selección tendría lugar cuando el daño es inducido por estrés térmico escrotal pero no cuando es inducido por radiación.

Estos resultados indican que tras la monta post-ovulación hay una selección general que criba los espermatozoides con baja motilidad y ADN fragmentado durante el transporte a través del útero y en la interacción con la ZP. La capacidad de la ZP para prevenir la fecundación por espermatozoides portadores de ADN fragmentado se produce durante la penetración y depende del tipo de daño.

INTRODUCCIÓN

El daño presente en el ADN es un parámetro que va ganando interés en la comunidad científica debido a su potencial contribución a procesos de infertilidad. La etiología de este daño en el ADN espermático puede ser muy variada, atribuyendo su origen a diferentes drogas, quimioterapia, terapia radioactiva, tabaquismo, tóxicos ambientales, inflamación del tracto reproductivo, hipertermia testicular, varicocele, factores hormonales [revisado en (Oliva, 2006)]. La integridad del ADN espermático juega un papel crítico en la fecundación de los mamíferos y en el desarrollo embrionario posterior. Se ha demostrado que las células espermáticas con ADN dañado o fragmentado pueden fecundar el ovocito *in vitro*. Algunos autores consideran que esta situación también sucede *in vivo* (Fatehi et al., 2006) y que los espermatozoides altamente móviles no difieren ni en tipos ni en frecuencias de las anomalías cromosómicas que son originadas por espermatozoides no seleccionados en base a su motilidad (Estop et al., 1990). Sin embargo, se ha publicado en humanos que la selección de espermatozoides basada en su motilidad, mediante swim-up, excluye muchos espermatozoides con evidentes anomalías ultraestructurales confirmadas por TUNEL (Piomboni et al., 2006); también hay una correlación entre motilidad espermática y estructura cromatínica medida mediante SCSA (Giwerzman et al., 2003) y que el binomio fragmentación del ADN y motilidad afectan a la tasa de fecundación (Huang et al., 2005). El trayecto del espermatozoide desde el lugar donde es depositado hasta el sitio de fecundación es un proceso dinámico (tanto por parte del espermatozoide como del tracto reproductivo femenino) y altamente complejo, que se regula para maximizar el éxito en la fecundación y asegurar que los espermatozoides con morfología correcta y motilidad vigorosa serán los que fecundarán con éxito (Suarez and Pacey, 2006)

Aun existiendo un inmenso número de espermatozoides en el eyaculado, sólo una minoría es capaz de llegar a las proximidades del ovocito y cumplir los requisitos necesarios para fecundarlo. Esta reducción podría estar ocasionada por la presencia de mecanismos dentro del tracto reproductivo femenino que actúan como puntos de control para el proceso de selección espermático. Los tres principales mecanismos son (1) el microambiente generado en el tracto reproductivo y las moléculas presentes en los fluidos; (2) la interacción espermatozoide-oviducto (mecanismo pre-ovulación); y (3) la interacción espermatozoide-ZP (mecanismo post-ovulatorio). En diferentes especies, el periodo desde la aparición del estro hasta la ovulación cubre varias horas o incluso días (Du Mesnil du Buisson and Signoret, 1970; Hunter and Dziuk, 1968) lo que demuestra que los espermatozoides que llegan al oviducto poco después de la monta, pueden mantener su competencia para fecundar hasta la ovulación. Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* indican que el oviducto proporciona un ambiente adecuado que extiende la vida fértil del espermatozoide hasta que las señales asociadas a la ovulación les indican que debe viajar hasta el ámpula para fecundar (Suarez and Pacey, 2006). La adhesión al oviducto por parte del espermatozoide juega un papel fundamental en la selección y almacenamiento de los mismos hasta la ovulación. De hecho, diferentes estudios indican que sólo el espermatozoide que porta acrosoma intacto (Liu and Baker, 2007) y no capacitado (Shalgi et al., 1992), con una morfología óptima (Hoshi et al., 1996) y estructura cromatínica

correcta puede adherirse a las células del epitelio tubal en placas *in vitro* (Gualtieri and Talevi, 2000). Se ha sugerido que la interacción entre el espermatozoide y la ZP representa un paso adicional en la selección espermática. De hecho, el anclaje del espermatozoide a la ZP selecciona espermatozoides con motilidad progresiva, morfología normal y óptima estructura cromatínica (Liu and Baker, 1992a), pudiendo discriminar los espermatozoides portadores de anomalías cromosómicas (Van Dyk et al., 2000).

Hasta la fecha, no se ha determinado si el proceso de selección para la fecundación en mamíferos *in vivo* incluye la calidad del ADN portado por los espermatozoides. Algunas evidencias apuntan a la posibilidad de una selección natural que podría discernir espermatozoides con este tipo de alteración. En humanos, se ha publicado que *in vitro*, espermatozoides con daño en hebra simple de ADN o ADN desnaturalizado se anclan menos o incluso no se anclan a la ZP (Liu and Baker, 2007)). En porcino, los espermatozoides con cromatina estable son más proclives a anclarse al oviducto y atravesar el tracto reproductivo *in vivo* (Satake et al., 2006) alcanzando al ovocito y penetrando la zona pelúcida. Si se parte de la hipótesis de que el tracto reproductivo femenino no puede evaluar la calidad del ADN directamente, la selección tiene que estar fundamentada en el fenotipo y funcionalidad del espermatozoide (Holt and Van Look, 2004; Satake et al., 2006)

En este trabajo, el objetivo fue analizar, utilizando el modelo murino, si hay un mecanismo de selección espermática para espermatozoides con ADN no fragmentado en el tracto reproductivo femenino y/o la zona pelúcida. Se utilizaron dos modelos en los que el daño al ADN fue inducido bien por un proceso natural (estrés térmico escrotal) o por un proceso artificial (radiación ionizante con ^{137}Cs). Previamente se había demostrado que el estrés térmico escrotal no severo estaba asociado a un incremento en el número de roturas en las hebras de ADN, reducción de la motilidad y viabilidad del espermatozoide, con lo que finalmente se originaba un cuadro de subfertilidad (Perez-Crespo et al., 2008b). Por otra parte, se ha descrito que la radiación ionizante origina fundamentalmente roturas en cadena de ADN (tanto roturas simples como dobles), incrementando la producción de radicales libres de oxígeno (Gudkov et al., 2006). Esta situación induce daño no sólo sobre la propia estructura del ADN sino también sobre las proteínas que promueven su compactación (Miller et al.) (Barratt et al.; Bjorndahl and Kvist; Ward).

Se realizaron cruces post-ovulación con machos tratados para evaluar el mecanismo de la selección post-ovulación que opera en la naturaleza y para encontrar si estos mecanismos pueden discriminar la calidad del ADN espermático en función del tipo del daño ocasionado, bien natural (estrés térmico) o no natural (radiación). Las montas después de la ovulación impiden el anclaje del espermatozoide al oviducto, y con ello se restringen los posibles mecanismos de selección espermática por parte del tracto reproductivo femenino, simplificando el estudio del proceso.

En ambos modelos, la fragmentación del ADN espermático se analizó utilizando la técnica de COMET, tanto en espermatozoides recogidos del tracto reproductivo femenino como de los anclados a la ZP. También se registró el número de embriones y fetos concebidos por estos mismos machos sujetos a ambos tratamientos, aportando una información adicional respecto a la calidad espermática. Por último, para profundizar en el papel de la zona pelúcida como mecanismo de selección natural, se recurrió a técnicas de Reproducción Asistida (TRAs) tales como la Fecundación *In Vitro* (FIV) y la Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI)

Entender mejor los mecanismos naturales de selección ayudará a establecer cuál es el test de laboratorio más adecuado para determinar la capacidad fecundante de una muestra espermática. Esto es de crucial importancia en ciertas situaciones como por ejemplo cuando se realiza ICSI, una técnica reproductiva que elude cualquier mecanismo de selección natural.

MATERIAL Y MÉTODOS

FASE 1. EXPERIMENTOS IN VIVO

Todos los animales utilizados se estabularon bajo condiciones controladas de temperatura (23°C), humedad relativa (40%) así como ciclo de luz (14 h de luz/ 10 h de oscuridad) con acceso ilimitado a comida y agua siguiendo las directrices del RD 1201/05. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el comité ético del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (I.N.I.A)

Machos adultos CD-1 (Harlan, Oxon, UK) de 12 semanas de edad, fueron manipulados de acuerdo con Pérez-Crespo y col (Perez-Crespo et al., 2008b) para realizar el tratamiento de calor escrotal. Los machos fueron anestesiados utilizando una dosis intraperitoneal de 1 mg de ketamina y 0,1 mg de xilacina por cada g de peso corporal. Para evitar la retracción de los testículos a la cavidad abdominal, se colocó un cordón de algodón alrededor del escroto sin comprometer la vascularización de la zona. Los machos fueron colocados en un flotador de poliestireno de manera que la parte media del macho estuviese sumergida en agua a 42°C. Después del procedimiento, los animales fueron colocados en una placa a 25°C para su recuperación. En la mañana de los días 21 -25 días después del tratamiento, cada macho fue puesto en cruce con 1 o 2 hembras (CD-1), que habían sido seleccionadas el día anterior por encontrarse en fase de proestro-estro

Para el experimento de radiación, los machos fueron tratados como se describe en (Baulch et al., 2007), recibiendo una dosis de 4 Gy de una fuente atenuada de ^{137}Cs . Se utilizó un aparato de radiación J.L.Shepherd & Associates (San Fernando, CA), modelo 30 calibrado ^{137}Cs γ -ray (110 Ci), con una dosis de 1,25 Gy/min. Los animales control fueron introducidos en el mismo aparato sin llevar a cabo proceso alguno de irradiación. Durante el procedimiento se llevó a cabo una medición de la radiación emitida utilizando un medidor-dosímetro termoluminiscente (TLD-100 LiF en polvo, Englehard, Harshaw, OH suministrado por Radiation Detection, Sunnyvale, CA). Las medidas de radiación en el aire fueron convertidas a dosis absorbidas. A los 21-25 días después de los tratamientos, los machos fueron cruzados con hembras CD-1 en estro, en una proporción 1:1 o 1:2.

La monta se determinó en base a la aparición del tapón vaginal. El primer examen se realizó a los 30 min de poner en contacto a los animales, realizándose seguimiento cada 30 min durante las 2 h siguientes. Las hembras se sacrificaron siempre 2 h después de la visualización del tapón vaginal, con el fin de evaluar la llegada de espermatozoides a la zona de fecundación tras ese tiempo (Yamauchi and Ward, 2007b). Los tractos reproductivos se limpiaron de grasa, eliminándose los vasos. Cada cuerno uterino fue seccionado a 3 niveles (Kawano and Yoshida, 2007), a nivel del extremo del cérvix, a nivel de la unión útero-tubal y en un punto medio del

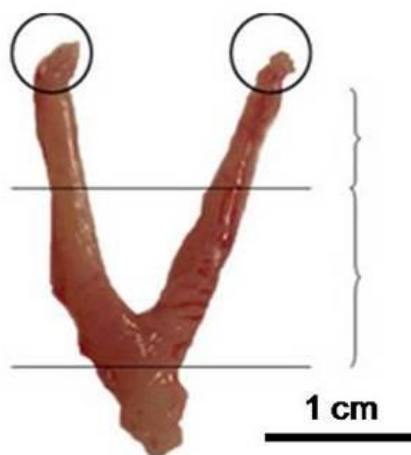


Fig. 3 Diferentes secciones en las que se dividió el tracto uterino para realizar el análisis de poblaciones espermáticas y fragmentación de ADN.

útero, obteniendo 3 regiones bien diferenciada: el oviducto aislado (Ov), la región uterina proximal (cercana a la unión útero-tubal) y la región uterina distal, cercana al cérvix (Uc) (Fig. 3). El contenido de cada una de las partes fue lavado utilizando PBS libre de iones calcio y magnesio. Los niveles de fragmentación en el ADN portado por los espermatozoides epididimarios fueron analizados también. Para ello, los epidídimos y vasos deferentes fueron aislados y colocados en gotas atemperadas de PBS (500 μ l). El aislamiento de los espermatozoides se realizó por incisiones sucesivas con una aguja de 30G en el epidídimo, permitiéndole durante 15 min a 37°C recuperar su motilidad. Otro grupo de hembras se dejó gestar hasta el día 14 para evaluar el número de fetos y reabsorciones en cada uno de los tratamientos.

El recuento espermático se llevó a cabo tanto en animales tratados como en animales control utilizando una cámara de Bürke. La motilidad se determinó de forma subjetiva, evaluándose por parte de dos operadores independientes y en 3 campos diferentes del portaobjetos.

FASE 2. EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Machos adultos CD-1 sometidos tanto a calentamiento escrotal como a radiación, tal y como se describió anteriormente, se sacrificaron entre los 21 y 25 días después de los tratamientos. Para llevar a cabo la fecundación *in vitro* (FIV) se siguió el protocolo descrito por Sztein (Sztein et al., 2000). Se superovularon hembras maduras B6CBAF1 mediante inyección intraperitoneal de 7,5 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG, folligon, Intervet) seguida de 5 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG, Lepori) 48 h más tarde. Catorce horas después de la inyección de hCG, las ratonas fueron sacrificadas por dislocación cervical, aislando los oviductos. Mediante una pequeña incisión en la zona del ámpula, se obtuvieron los complejos cúmulo-ovocito. Las células del cúmulo fueron dispersadas en presencia de hialuronidasa (300 μ g/ml, en medio M2). Entre 20 y 30 ovocitos fueron puestos en cada gota de fecundación. Los

espermatozoides fueron incubados en HTF (suplementado con BSA) durante 30 min a 37°C con 5% de CO₂. Después de la incubación, utilizando una pipeta automática, entre 10 y 15 µl de suspensión de espermatozoides procedente de la parte periférica de la gota de capacitación fue transferida a la gota de fecundación. Después de 5 h parte de los ovocitos fueron lavados 3 veces en HTF y 2 veces más en KSOM antes de ser puestos en cultivo en KSOMaa durante 24 h para analizar la tasa de división (embriones en 2 células). Los cigotos confirmados se dejaron cultivar hasta estadio de blastocisto. El resto de los ovocitos se destinó a los estudios de “binding” que se describe a continuación

RECOGIDA DE MUESTRAS DE ESPERMATOZOIDES IN VITRO PARA ANÁLISIS DEL BINDING

La parte de los ovocitos no destinada a cultivo que fueron puestos a fecundar, se lavaron transcurridas 2 h del comienzo de la fecundación para eliminar los espermatozoides ligeramente adheridos a la ZP. Hecho esto, los espermatozoides más íntimamente unidos a la ZP fueron fijados en 0,5% de glutaraldehído, junto con el ovocito, durante 30 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, los ovocitos fueron lavados 3 veces y transferidos a la gota de tinción (Hoechst 2,5 µg/ml en PBS-PVA) durante 15 min Finalmente, los ovocitos fueron puestos en medio de montaje (50% glicerol v/v en PBS-PVA) y se procedió al recuento de las cabezas de espermatozoides ancladas a la ZP (Fig. 4).

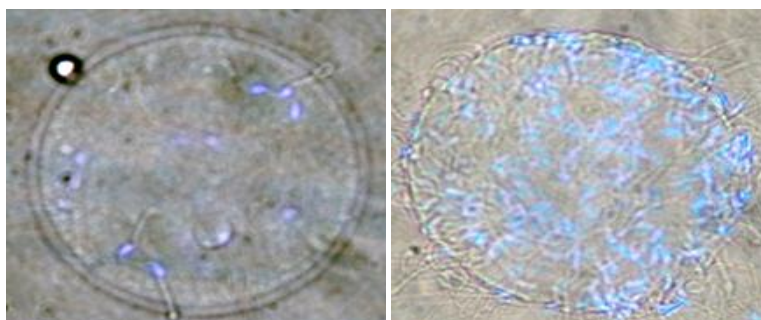


Fig. 4 Imágenes de ovocitos fijados en Glutaraldehído al 0,5% y teñidos con Hoechst para visualización de espermatozoides anclados a la ZP.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE ESPERMATOZOIDES IN VITRO PARA ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN.

Los espermatozoides unidos a la superficie de la ZP fueron recuperados mediante vigorosas y repetidas aspiraciones realizadas con una pipeta de un diámetro interno ligeramente inferior al diámetro del ovocito. Este procedimiento fue llevado a cabo en una placa de 35 mm con 30 µl de PBS suplementado con BSA al 0,5%. Los espermatozoides recolectados de esta manera fueron usados en COMET.

INYECCION INTRACITOPLASMATICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI)

La ICSI fue realizada en medio M2 a temperatura ambiente. Cada volumen de esperma utilizado fue mezclado con cinco volúmenes de M2 conteniendo un 10% de PVP para disminuir la adherencia de los mismos al vidrio. La placa donde se realizaba la ICSI contenía una gota de manipulación (medio M2), algunas gotas de esperma (espermatozoides en M2/10% PVP) y una gota destinada a la limpieza de la aguja de inyección (M2/10% PVP) todo ello cubierto por aceite mineral. La inyección fue realizada con una unidad piezoeléctrica PMM-150 FU (Prime Tech, Japan) y un micromanipulador Eppendorf (Hamburg, Germany) utilizando una pipeta de extremo romo de 6-7 μm ; el microinyector piezo-eléctrico permite la conversión del pulso eléctrico en percusión mecánica. La gota que contenía los espermatozoides era renovada cada hora. Las cabezas de espermatozoides en cada grupo experimental se inyectaron en los ovocitos en tandas de 10 a 15. Después de 15 min de recuperación a temperatura ambiente en medio M2, los ovocitos que sobrevivieron al procedimiento fueron transferidos a gotas de KSOMaa (20 ovocitos en cada gota) y cultivados a 37°C y 5% de CO₂. Se determinó el número de embriones en estadio de 2 células y el desarrollo a mórula y blastocisto.

ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO MEDIANTE COMET

Una alícuota de una suspensión de espermatozoides en PBS (60 μl) fue mezclada con agarosa de bajo punto de fusión (1% w/v). Se aplicaron 100 μl de esta preparación sobre la superficie de portaobjetos pretratados (cubiertos con una capa de 1% de agarosa de punto de fusión normal y deshidratada). Inmediatamente se cubrieron con un cubreobjetos (tamaño 24x60 mm) dejándose solidificar durante 30 min a 4°C. Posteriormente, los cubreobjetos fueron retirados y los portaobjetos se sumergieron en solución de lisis (Trevigen Inc, Gaithersburg, MD, EEUU) suplementada con ditiotreitól (DTT, 40 mM, Sigma) y Proteinasa K (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma) durante 90 min a 37°C y protegiéndolos en todo momento de la luz. Tras la lisis, los portaobjetos fueron lavados en tampón de electroforesis (TBE, 50 mM TRIS, 50 mM Borato sódico, 1 mM, Sigma) durante 5 min. Las muestras se colocaron en una cubeta de electroforesis horizontal (www.biocomdirect.com) y equilibradas durante 20 min con TBE antes de la electroforesis (25V, 300 mA) durante 7 min. Al cabo de este tiempo las muestras fueron neutralizadas en Tris-HCl durante 5 min. Los portaobjetos, una vez aclarados con agua y secados al aire, se guardaron protegido de la luz hasta el análisis

CUANTIFICACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

Los microgeles fueron teñidos con SYBR como fluoróforo (dilución 1:10000; Molecular Probes). Las células fueron visualizadas a 200 aumentos utilizando un microscopio de epifluorescencia (Optiphot 2; Nikon, Tokyo, Japan). Se analizaron las muestras, a nivel cuantitativo, utilizando una cámara CCD (Nikon Coolpix S5000, Nikon, Tokyo, Japan) acoplada al microscopio. Las fotografías tomadas se analizaron con el software para COMET llamado CometScore (TriTek Inc. Northern Virginia, Washington DC, EEUU). Se seleccionaron al azar cien células en cada portaobjetos. Los parámetros analizados fueron: longitud de cola, porcentaje de ADN en cola y

momento de cola. La longitud de cola es la distancia que migran, en presencia de un campo eléctrico, los fragmentos de ADN rotos desde el núcleo. El porcentaje de ADN en cola es la cantidad de ADN que hay en la cola procedente del núcleo espermático (ADN roto por tanto). Finalmente, el momento de cola, es el producto de la longitud de cola por el porcentaje de ADN en cola.

ANÁLISIS DE FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO: ROTURAS EN CADENA SENCILLA

Las alícuotas de espermatozoides procedentes de animales tratados y control se lavaron dos veces con PBS congelándose a continuación a -80°C . Los pellets congelados fueron descongelados y resuspendidos en 0,6 ml de tampón STE (50 mM NaCl, 10 mM tris-HCl pH 8, 1 mM AEDT, 1% (v/v) SDS, 1% β -Mercaptoetanol, 2 mg/ml Proteinasa K) durante 8 h. Transcurrido este tiempo, se extrajo el ADN mediante el método clásico fenol/cloroformo. El ADN purificado se resuspendió en TAE pH 8.

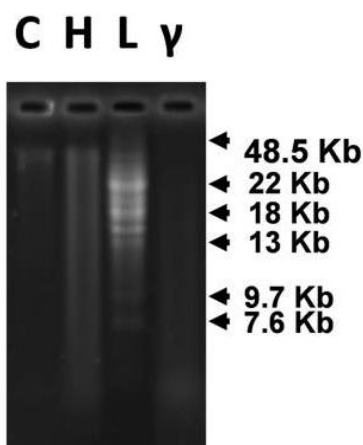


Fig. 5 Imagen de un gel de agarosa (0,5%) tras revelado con bromuro de etidio (1 $\mu\text{g/ml}$) y electroforesis alcalina. C: ADN extraído de espermatozoides procedentes del grupo control; H: ADN extraído de espermatozoides procedentes del grupo de estrés térmico escrotal; γ : ADN extraído de espermatozoides procedentes del grupo de radiación ionizante. L: marcadores de peso molecular.

ELECTROFORESIS ALCALINA

El protocolo fue adaptado de Bennetts y Aitken (Bennetts and Aitken, 2005) con ligeras modificaciones. Un gel del 0,5% de agarosa conteniendo 50 mM NaCl y 4 mM AEDT, fue preparado y equilibrado en tampón alcalino de desarrollo electroforético (30 mM NaOH, 2 mM AEDT) durante 1 h previo a la carrera. Las muestras fueron tratadas con tampón de carga y cargadas en el gel. La electroforesis se desarrolló a un voltaje constante de 1V/cm durante 7 h. Al cabo de este tiempo se lavó el gel y se neutralizó en 200 ml 0.4M Tris-HCl, pH 8, durante 30 min. Finalmente fue teñido con 1 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio.

HISTOLOGÍA

Los animales control, estresados térmicamente y radiados fueron sacrificados por dislocación cervical, fijando sus testículos en fluido Davidson modificado (Latendresse et al., 2002) durante 48 h. Posteriormente fueron lavados en PBS y almacenado en etanol al 70% hasta su preparación. Para ella, los testículos fueron embebidos en parafina y cortados en secciones seriadas de 5 µm de grosor. Finalmente, todas las secciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina.

ESTADÍSTICA

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el software SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA). Todos los datos se reflejan en su forma de media \pm error estándar. Todas las comparaciones realizadas entre grupos siguieron un análisis de la varianza (ANOVA) con un test post-hoc tipo Student-Knewman-Kleus.

RESULTADOS

EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL RATÓN Y CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS.

La fragmentación del ADN fue inducida por estrés térmico escrotal y radiación ionizante. Se obtuvo el espermatozoide entre los 21 y 25 días posteriores al tratamiento es decir cuando los

Tabla 2 Efecto del tratamiento sobre el peso corporal, testicular y epididimario así como características espermáticas (motilidad y concentración)

	Grupo de tratamiento		
	Control (n=9)	Estrés Térmico Escrotal (n=8)	Radiación y (n=10)
Peso Corporal (g)	39.06 ± 1.69	35.96 ± 0.73	36.72 ± 0.74
Peso Testículos (mg)	239 ± 14 ^a	138 ± 10 ^b	127 ± 5 ^b
Proporción P. Test/P. Corp	6.06 ± 0.88 ^a	2.54 ± 0.36 ^b	3.47 ± 0.13 ^b
Peso epidídimo (mg)	133.0 ± 10.5	113.5 ± 10.7	133 ± 27
Concentración espermática (x10⁶)	11.6 ± 0.8 ^a	4.4 ± 1.7 ^b	7.6 ± 1.3 ^c
Población Espermatozoides Móviles (%)	69 ± 3 ^a	21 ± 5 ^b	52 ± 4 ^c

Valores con diferentes superíndices en cada fila indican diferencias significativas entre ellos (P<0.05) (análisis ANOVA)

espermatozoides obtenidos estaban en fase de espermátida temprana en el momento de la irradiación o el shock térmico. Se seleccionó esta etapa basándose en estudios previos que demuestran que es una de las etapas más sensibles de la espermatogénesis (Perez-Crespo et al., 2008b).

Ninguno de los tratamientos estudiados tuvo efecto significativo sobre el peso corporal de los animales tratados. Si se produjo una reducción del peso testicular en ambos casos (Tabla 2). Ambos tratamientos redujeron el número de espermatozoides y la motilidad de los mismos. Las consecuencias negativas sobre estos parámetros fueron significativamente más altas en el grupo de estrés térmico que en el grupo radiado.

MORFOLOGÍA DE LOS TÚBULOS SEMINÍFEROS.

El examen histológico de los testículos reveló total normalidad en la espermatogénesis de los animales control (Fig. 6). Treinta minutos de exposición a 42°C, produjeron una depleción general de células dentro de los túbulos, tanto de espermatozoides como Sertoli aunque la mayoría de ellos mantenían la presencia de espermatozoides maduros. En algunas de las células presentes se apreciaron núcleos picnóticos y vacuolización. También se apreció una disminución en la población de células de Leydig. El análisis de los testículos del grupo radiado, reveló una total carencia de espermatozoides en los túbulos y la aparición de núcleos picnóticos (indicando condensación de la cromatina) y necróticos en las espermatidas. La desorganización de los túbulos fue notablemente mayor que en el grupo control y la población de células Leydig se encontraba aumentada

EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA IMPLANTACIONES, REABSORCIONES Y PREÑECES. CALIDAD DE LOS EMBRIONES PRODUCIDOS IN VIVO

Mientras que el 100% de las hembras cubiertas con machos control (13 de 13) o irradiados (12 de 12) quedaron gestantes, se observó una marcada reducción en las tasas de preñez en el grupo de estrés térmico escrotal (6 de 18). En este grupo además descendió la tasa de implantación (Fig. 7), sin embargo el número de fetos vivos en las hembras cubiertas por machos del grupo de radiación ionizantes fue más bajo que los observados en el grupo de estrés térmico.

INTEGRIDAD DEL ADN DE ESPERMATOZOIDES RECOLECTADOS DEL UTERO Y OVIDUCTO

Los espermatozoides fueron recuperados del tracto reproductivo de hembras cruzadas con machos 21-25 días después de los tratamientos; se recolectaron de tres regiones diferentes: oviducto aislado (Ov), la región próxima a la unión útero-tubal (Uo) y la porción distal cercana al cérvix (Uc) (Fig. 1). Se realizó COMET en su versión neutra y electroforesis alcalina (Fig. 5) para evaluar el daño, en términos de fragmentación, en hebra doble o simple de ADN.

Los espermatozoides del epidídimo de ratones tratados con calor (estrés térmico) mostraron un índice de daño en el ADN (cuantificado por COMET) significativamente mayor que los presentados en los grupos control y radiado (Tabla 3, columna Ep). En todos los grupos (control y tratados), la fragmentación del ADN en los espermatozoides recuperados de las regiones alta y baja del útero (Uc y Uo) fue mayor que en los espermatozoides recolectados del oviducto (Ov)

Cuando se clasificaron las poblaciones espermáticas según su longitud de cola (Fig. 8), se observó que la población mayoritaria recogida del oviducto tenía valores de longitud de cola bajos, tanto en el grupo control como en el grupo de estrés térmico; sin embargo las

poblaciones de espermatozoides recuperadas del epidídimo, así como de las regiones uterinas (Uc y Uo) tuvieron valores de longitud de cola de más de 55 pixels.

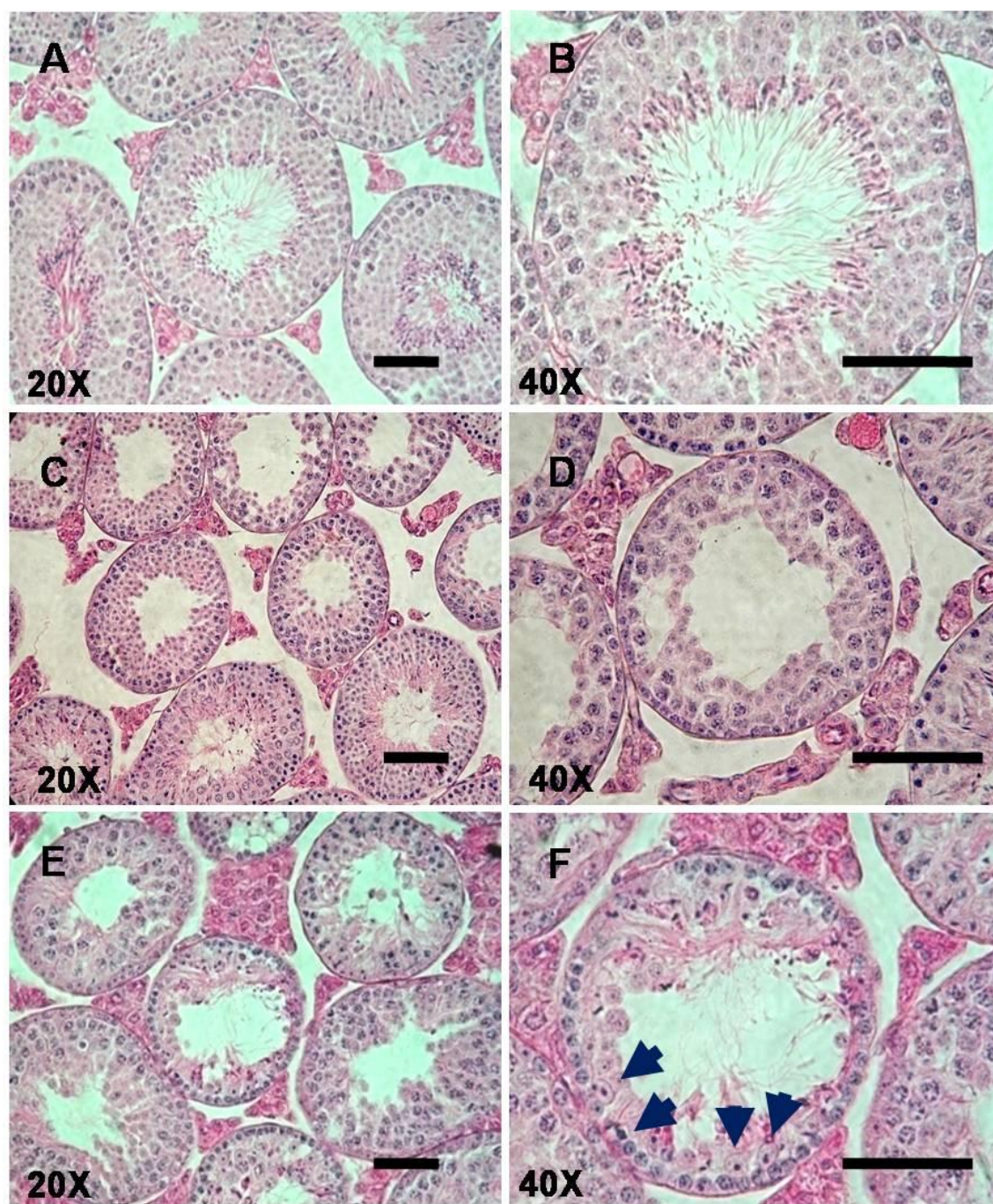


Fig. 6 Comparación histológica de túbulos seminíferos procedentes de testículos. Grupo Control (A, B); testículos 21-25 días después de tratamientos a 42°C, 30 min (C, D) y testículos 21-25 días después de tratamiento con radiación ionizante (E, F). Tinción hematoxilina/eosina. Flechas indican células picnóticas. Escala 50 μ m.

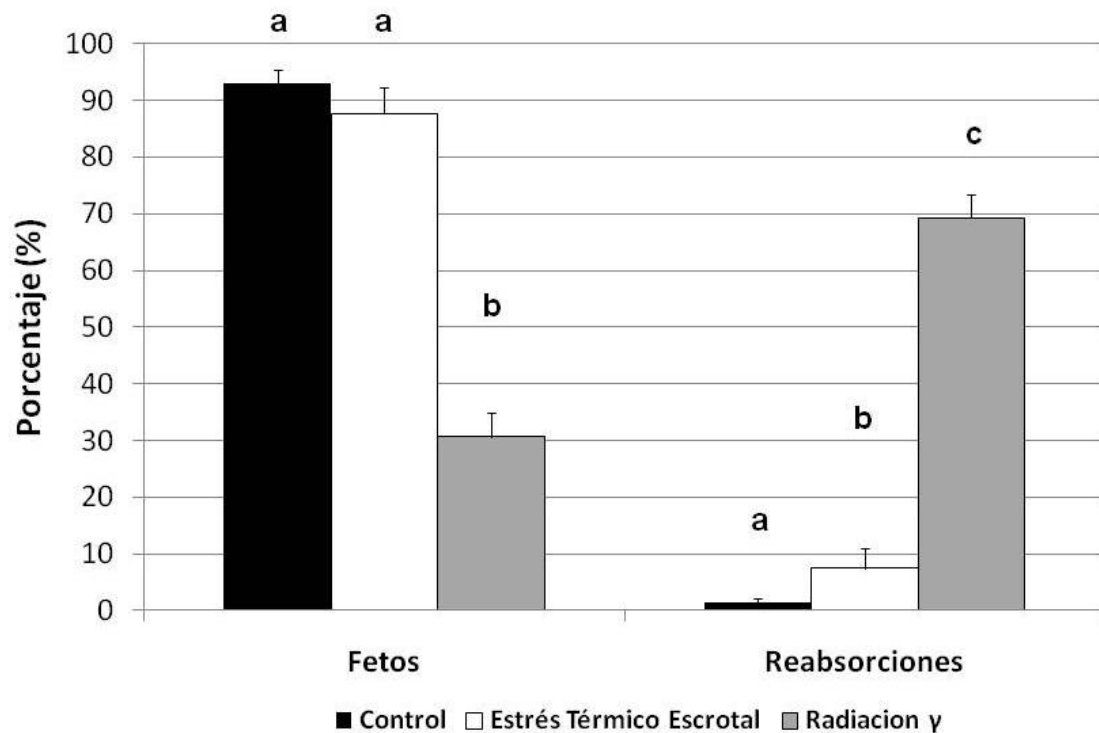
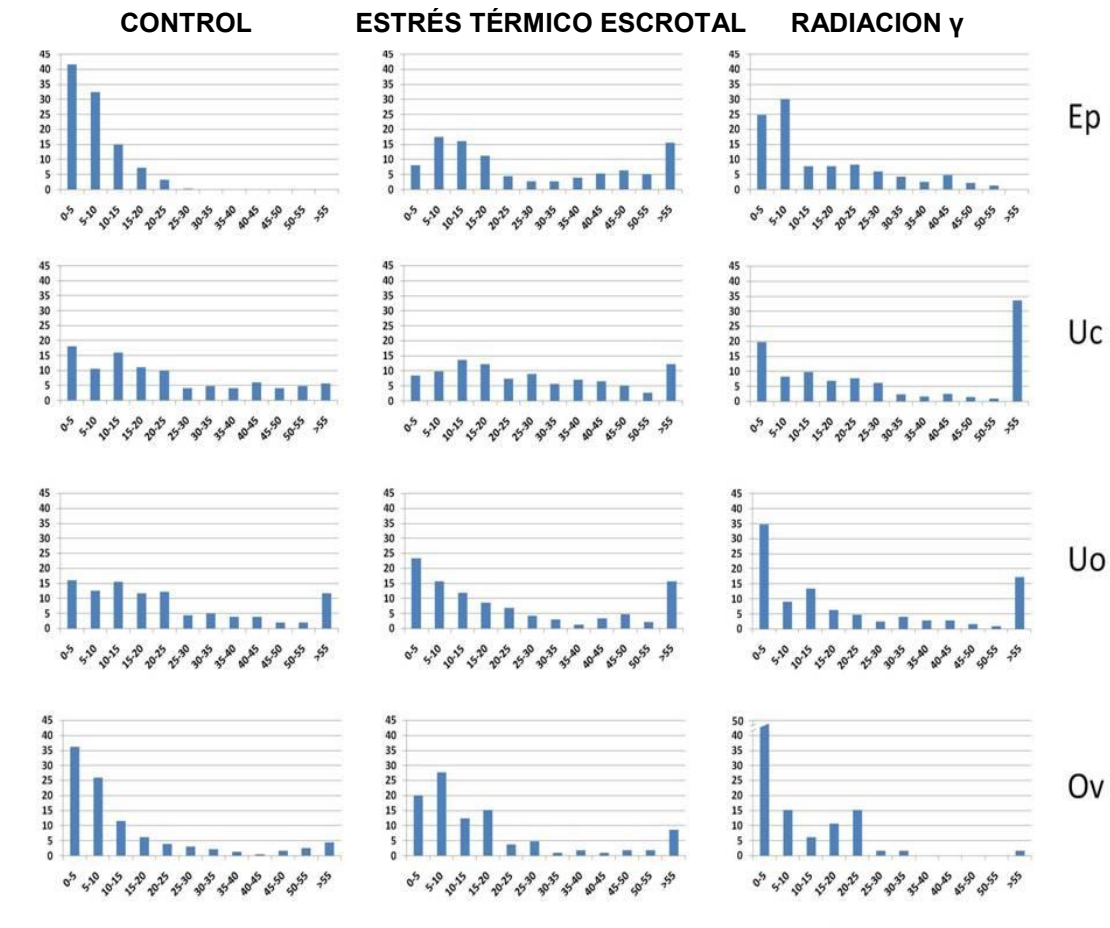


Fig. 7 Porcentaje de fetos y reabsorciones observadas en hembra en día 14 post-coito, grupo control (n=13, 13 de 13 preñadas), estrés térmico escrotal (n=18, 6 de 18 preñadas) y radiación ionizante (n=12, 12 de 12 preñadas) Media \pm error estándar. Valores con diferentes superíndices indican diferencias significativas ($P < 0,05$, ANOVA)

Tabla 3 Efecto del estrés térmico escrotal y radiación γ sobre el parámetro longitud de de cola en los análisis de COMET (pH 8) de espermatozoides recolectados del epidídimo y de las diferentes secciones uterinas.

Tratamiento	Longitud de Cola (px)			
	Ep	Uc†	Uov†	Ov†
Control (n=8)	6.71 \pm 0.82 ^{aa}	30.94 \pm 5.62 ^b	25.71 \pm 2.42 ^b	8.86 \pm 0.8 ^a
Estrés Térmico Escrotal (n=9)	38.96 \pm 4.09 ^{aβ}	38.37 \pm 4.66 ^a	29.39 \pm 3.52 ^a	11.20 \pm 1.50 ^b
Radiación γ (n=8)	17.20 \pm 3.58 ^{av}	44.58 \pm 12.08 ^b	32.38 \pm 9.58 ^{ab}	11.18 \pm 2.99 ^b

Longitud de cola de los espermatozoides recuperados en las diferentes secciones analizadas, Dentro de un mismo tratamiento se han marcado con diferentes letras latinas en cada fila; las diferencias entre secciones, Las diferencias entre tratamientos dentro de una misma sección del tracto (en cada columna) se han señalado con letras griegas Letras diferentes por tanto, muestran diferencias significativas ($P < 0,05$). Ep, espermatozoides epididimarios; Uc, población espermática recogida del tracto uterino cercano al cérvix; Uo, población espermática recuperada del tracto uterino cercano al oviducto; Ov, población espermática recogida del oviducto. † Indica que no hay diferencias significativas entre tratamientos dentro de una sección.



RANGO DE LONGITUD DE COLA (px)

Fig. 8 Porcentaje de espermatozoides con ADN dañado expresado en forma de longitud de cola tras COMET recolectados de las diferentes secciones uterinas y del propio epidídimo de machos tratados. Ep, espermatozoides epididimarios; Uc, población espermática recogida del tracto uterino cercano al cérvix; Uo, población espermática recuperada del tracto uterino cercano al oviducto; Ov, población espermática recogida del oviducto

INTEGRIDAD DEL ADN PORTADO POR ESPERMATOZOIDEOS ANCLADOS A LA ZONA PELUCIDA.

Dos horas después de la FIV, los espermatozoides anclados a la zona pelúcida (ZP) fueron analizados y comparados con los que no se unieron a ella. Todos los espermatozoides recuperados de la zona pelúcida y que procedían tanto del grupo de estrés térmico como los que lo hacían del grupo de machos radiados, presentaron niveles de fragmentación inferiores a los de los espermatozoides que no se unían (Tabla 4), indicando una selección por parte de la zona pelúcida a favor de espermatozoides con baja fragmentación de su ADN. El parámetro longitud de cola en los espermatozoides anclados a ZP procedentes del grupo de radiación ionizante, fue mayor que en el grupo de estrés térmico y grupo control.

CAPÍTULO I

Tabla 4 Efecto del estrés térmico escrotal y radiación γ sobre los parámetros longitud de cola y momento de cola en los análisis de COMET (pH 8) de espermatozoides anclados a la zona pelúcida (ZP) o no anclados (FIV) después de Fecundación *In Vitro*.

Tratamiento	Longitud de Cola		Momento de Cola	
	FIV	ZP†	FIV	ZP†
Control (n=8)	16.20 \pm 1.02 ^{aα}	14.76 \pm 3.98 ^a	4.55 \pm 0.56 ^{aα}	3.72 \pm 1.30 ^a
Estrés Térmico Escrotal (n=9)	26.64 \pm 3.34 ^{aβ}	15.96 \pm 2.92 ^b	14.82 \pm 2.34 ^{aβ}	8.96 \pm 3.31 ^a
Radiación γ (n=8)	46.95 \pm 6.55 ^{aγ}	21.43 \pm 5.84 ^b	29.90 \pm 6.34 ^{aγ}	8.68 \pm 3.15 ^b

Diferencias significativas en longitud de cola de los espermatozoides recolectados de las diferentes localizaciones analizadas, dentro de un mismo tratamiento se han marcado con diferentes letras Latinas en cada fila; diferencias entre localizaciones, se han marcado con diferentes letras griegas, en cada columna. Letras diferentes por tanto, muestran diferencias significativas ($P < 0,05$). Ep, espermatozoides epididimarios; FIV, población espermática recogida de la gota de fecundación; ZP, espermatozoides anclados a la zona pelúcida. † Indica que no hay diferencias significativas entre tratamientos dentro de ZP.

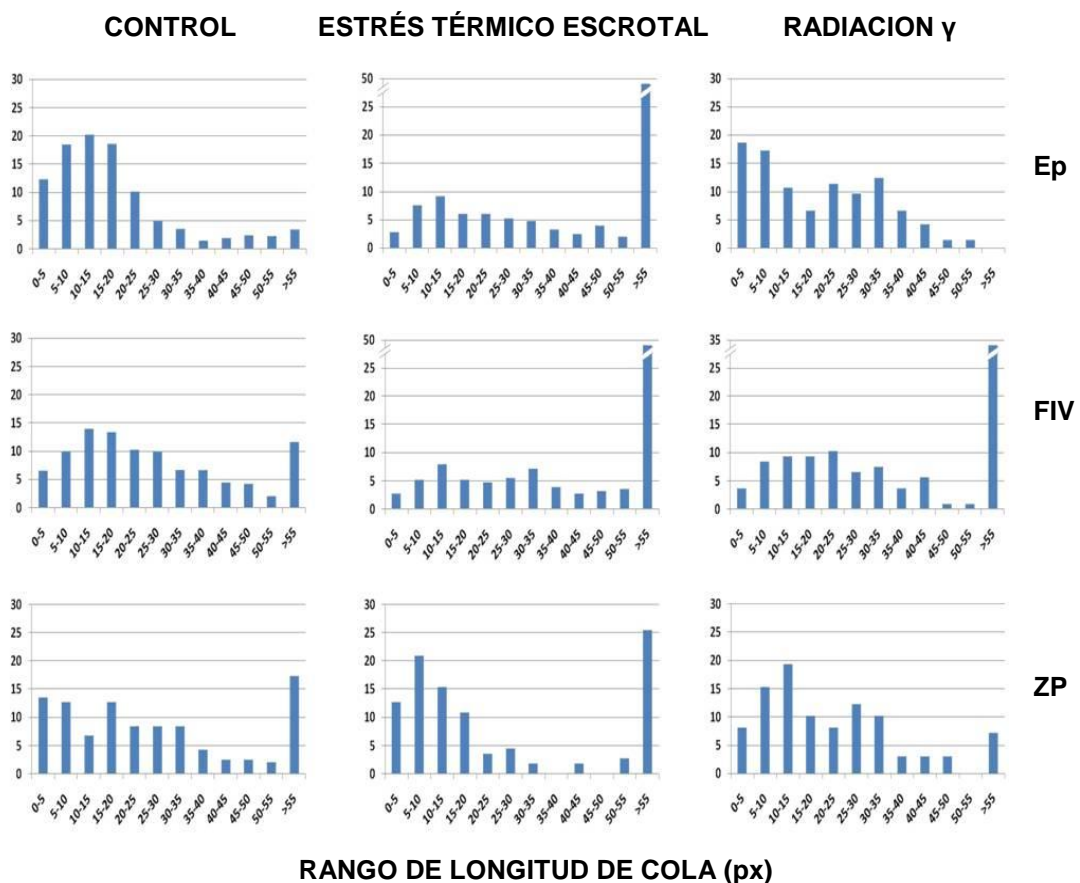


Fig. 9 Porcentaje de espermatozoides con ADN dañado expresado en forma de longitud de cola tras COMET recolectados de las diferentes secciones uterinas y del propio epidídimo de machos tratados. Ep, espermatozoides epididimarios; FIV, población espermática recogida de la gota de fecundación; ZP, espermatozoides anclados a la Zona Pelúcida.

EFFECTO DEL CALOR ESCROTAL Y LA RADIACIÓN IONIZANTE SOBRE LOS EMBRIONES PRODUCIDOS POR FIV E ICSI

Durante la FIV (Tabla 4), la proporción de ovocitos fecundados con espermatozoides procedentes del grupo de estrés térmico descendió significativamente (93% control frente al 13%, estrés térmico, $P<0,05$). Sin embargo, el desarrollo a blastocisto fue semejante (96% control frente al 83%, estrés, $P>0,05$). El marcado descenso del porcentaje de fecundación coincide con la menor motilidad que presentaron las muestras de esperma procedentes del tratamiento con calor. Sin embargo la tasa similar de desarrollo a blastocisto indica que el esperma procedente del grupo de estrés térmico que es capaz de fecundar no presenta alteración alguna que impida el correcto desarrollo preimplantacional del embrión. Sin embargo al analizar el grupo de radiación ionizante encontramos que la proporción de estos cigotos que se desarrolló hasta blastocisto (63%) era significativamente menor que los grupos control y estrés térmico. Este resultado sugiere que los espermatozoides sometidos a radiación son portadores de un tipo de daño que compromete el desarrollo del embrión. Cuando se eluden las barreras naturales de la fecundación, como ocurre al utilizar la ICSI, la tasa de división a 2 células descendió significativamente entre los grupos de estrés térmico y radiado. El desarrollo a blastocisto en estos grupos fue significativamente más bajo que en el grupo control sugiriendo una menor calidad de ADN.

Tabla 5 Porcentaje de ovocitos fecundados y desarrollo hasta blastocisto de los mismos en función de la técnica de reproducción asistida utilizada y el tipo de esperma aplicada en cada caso.

Técnica	Tipo de Espermatozoides	Ovocitos totales (n° exp.)	Embriones 2 células(%)		Blastocistos (%)
	Control	107 (5)	99 (93)		95 (96) ^a
IVF	Estrés Térmico Escrotal	223 (8)	29 (13) ^b		26 (90) ^a
	Radiación γ	85 (5)	56 (66) ^c		36 (63) ^b
Técnica	Tipo de Espermatozoides	Ovocitos inyectados (n° exp.)	Ovocitos supervivientes (%)	Embriones 2 células (%)	Blastocistos (%)
	Control	72 (3)	53 (74)	46 (87) ^a	31 (67) ^a
ICSI	Estrés Térmico Escrotal	232 (6)	158 (68)	74 (47) ^b	4 (6) ^b
	Radiación γ	131 (4)	94 (72)	65 (69) ^c	28 (43) ^c

Media ± error estándar. Valores con diferentes superíndices en cada fila indican diferencias significativas entre ellos ($P<0.05$) (Z-test)

DISCUSIÓN

El tracto reproductor femenino contiene la clave para la selección espermática en mamíferos. Después de la monta, existe una preselección de los espermatozoides basada en su motilidad. Los más aptos llegan a la unión útero-tubal y allí son “secuestrados” dentro del espacio reservado para ellos (zona de reserva oviductal) hasta que la ovulación tiene lugar. En ese momento los espermatozoides son liberados y se dirigen hacia los ovocitos. Cuando la monta tiene lugar después de la ovulación, los espermatozoides no tienen oportunidad de anclarse a las células oviductales, con lo que el único proceso de selección que pueden experimentar tiene lugar bien durante el transporte a través del tracto reproductivo de la hembra o durante la unión a zona pelúcida (ZP) a través de la unión y/o la penetración. El objetivo de este trabajo fue investigar en un modelo de monta post-ovulatoria (monta 6 a 8 h después de la ovulación), cuales son los mecanismos de selección que operan en la naturaleza y comprobar si estos mecanismos pueden discriminar la calidad del ADN portado por los espermatozoides independientemente del origen del daño, ya sea por un proceso natural (estrés térmico) o un proceso artificial (radiación ionizante). Nuestros resultados indican que en una monta post-ovulación existe una selección inicial de los espermatozoides con ADN no fragmentado durante su tránsito a través del tracto reproductor femenino y en la unión a zona pelúcida (ZP), pero la capacidad de la ZP de reconocer ADN fragmentado tiene lugar durante la penetración de la ZP, y depende del origen y del tipo de daño, ya que sólo se ejerció una selección a favor de los espermatozoides con ADN integro en los animales sometidos a estrés térmico. La selección inicial puede estar relacionada con la motilidad, ya que ésta última y la fragmentación del ADN están estrechamente relacionadas (Huang et al., 2005). Nuestros resultados demuestran que los espermatozoides con una mayor motilidad que llegan al oviducto tienen una menor fragmentación del ADN que los espermatozoides con una motilidad inferior presentes en el útero. Sin embargo, espermatozoides con cierto grado de daño en el ADN pueden llegar al oviducto y unirse a la ZP. Basándonos en estos resultados, la selección espermática ejercida por la ZP durante la penetración debería ser un mecanismo específico ya que opera cuando el ADN de los espermatozoides ha sido fragmentado por efecto del calor y no por la radiación. Se ha sugerido que la estructura cromatínica estable proporciona a los espermatozoides una rigidez que les permite penetrar la zona pelúcida (Bedford, 1998).

El daño producido en los testículos y en los espermatozoides bien por estrés térmico escrotal como por radiación con rayos gamma del cuerpo del animal es de diferente naturaleza y puede influir en la capacidad fecundante de los espermatozoides. El calor escrotal causó una disminución del peso de los testículos, del número de espermatozoides recuperados de los vasos deferentes de estos animales y de la motilidad, efectos ya descritos por otros autores (Gasinska and Hill, 1990). En el caso del tratamiento con radiación, aunque también se observó un descenso en el peso de los testículos, una situación que ya había sido reseñada por otros autores (Koruji et al., 2008); sin embargo, el descenso en el número de espermatozoides y en la motilidad espermática fue menos pronunciado que en el grupo del estrés térmico escrotal. De acuerdo con otros estudios (Paul et al., 2008a; Perez-Crespo et al., 2008b; Rockett et al.,

2001), el estrés térmico escrotal produce cambios en la arquitectura testicular y en el ADN portado por los espermatozoides. Los estudios histológicos realizados en este trabajo han demostrado una reducción de la espermatogénesis en ambos grupos; sin embargo, en los animales radiados se observó una hiperplasia de células de Leydig resultado de una situación anormal debida a una hiperestimulación hormonal; esta situación podría estar originada por el proceso de radiación que se llevó a cabo en todo el cuerpo del animal. En los casos de radiación con altas dosis, se ha observado una pérdida significativa de espermatoцитos primarios. El aumento de temperatura en el testículo está asociado con un incremento de radicales libres de oxígeno que reaccionan rápidamente con sustratos como lípidos generando peroxidación lipídica que afecta a la membrana del espermatozoide (Bansal and Bilaspuri, 2008). Junto con estos efectos, la membrana mitocondrial puede ser desestabilizada tanto en espermatozoides como en células germinales (Silva et al., 2007; Sleight et al., 2005) activando la muerte celular programada (apoptosis). El daño producido por la radiación gamma tiende a generar un daño más directo sobre el propio ADN (tanto en hebra simple como en doble) (Marchetti et al., 2007) y más específicamente, mutaciones y alteraciones del esqueleto de la molécula de ADN (formación de entrecruzamientos entre pares de bases, aductos proteína-ADN, generación de sitios apurínicos y/ apirimidínicos) (Gantchev et al., 2009). Las alteraciones en el esqueleto del ADN espermático podrían alterar los niveles de condensación cromatínica y el volumen nuclear (Ward and Coffey, 1991), parámetros relacionados con la susceptibilidad al daño causado por la radiación (Hawkins, 2005). Con el ensayo COMET que se ha utilizado en este trabajo para cuantificar la fragmentación del ADN en el espermatozoide no se puede identificar este tipo de mutaciones producidas por la radiación.

La motilidad del espermatozoide es la responsable de la llegada al oviducto a través de la unión útero-tubal (Nakanishi et al., 2004) pero parece que la motilidad no es el único factor en la selección espermática; las barreras químicas (bajo pH y la viscosidad del moco presente en el útero) y las respuesta leucocitaria/fagocítica dentro de la hembra, ocasiona que sólo una pequeña porción del espermatozoide inyectado tenga la oportunidad de encontrar el ovocito. Durante algunas fases del transporte a través del tracto reproductivo, el espermatozoide está sometido a estrés físico, factores que alteran la señalización celular y, entre otros, el daño oxidativo ocasionado a los lípidos de la membrana plasmática. Las etapas iniciales del transporte están mediadas por el tracto femenino, ya que el transporte espermático a su través está regulado por una combinación de motilidad y movimientos peristálticos procedentes del tracto reproductivo. Hemos observado un incremento en el nivel de fragmentación del ADN de los espermatozoides recuperados de útero respecto a la fragmentación observada a nivel epididimario, tanto en el grupo control como en el grupo de animales radiados; por otra parte, en el grupo de estrés térmico, la fragmentación del ADN portado por espermatozoides recolectados del útero fue similar a los valores presentados por los espermatozoides epididimarios. Estas observaciones indican que una parte sustancial del daño en el espermatozoide en los dos primeros casos está teniendo lugar en el útero. Dos mecanismos podrían ser responsables de este efecto. Por una parte, la presencia de células del sistema

inmune en la mucosa uterina (Schuberth et al., 2008; Taylor et al., 2008; Taylor et al., 2009). Los neutrófilos pueden utilizar su ADN, asociándolo a proteínas que forman entramados extracelulares neutrófilos (NETs) (Alghamdi and Foster, 2005) donde quedan retenidos los espermatozoides con motilidad o membrana plasmática alterada. Durante la disgregación de los NETs, juega un papel importante la enzima DNAsa, presente en el plasma seminal (Szczygiel and Ward, 2002; Yamauchi and Ward, 2007b) ya que puede estar actuando eliminando conexiones entre neutrófilos, espermatozoides y las proteínas que forman el entramado, ejerciendo una eficiente limpieza del tracto reproductivo. El segundo mecanismo responsable de la alta fragmentación del ADN en los espermatozoides uterinos podría ser la presencia de nucleasas procedentes del fluido seminal (Sakkas et al., 2002; Yamauchi and Ward, 2007a). Sin embargo, en el caso del estrés térmico no se observa este aumento de espermatozoides con ADN fragmentado en el útero con respecto al epidídimo, probablemente, porque los espermatozoides del epidídimo con ADN fragmentado (producido por el estrés térmico) no son capaces de llegar al útero, y por su baja o nula motilidad terminan su viaje en el lugar de deposición (vagina)

En consonancia con estudios previos nuestros resultados demuestran que el paso a través de la unión útero tubal *in vivo*, es uno de los puntos más importantes involucrados en un posible mecanismo de selección (Suarez and Pacey, 2006). Es en este proceso donde la fragmentación se reduce de una manera drástica, tanto en el grupo control como en los dos modelos de fragmentación estudiados y donde la motilidad podría ser un importante parámetro. Este fenómeno indicaría que hay un mecanismo de selección en el tracto reproductivo femenino que asegura la llegada al oviducto de aquellos espermatozoides portadores de un ADN íntegro bien por una selección directa de la integridad del ADN o por una correlación entre motilidad y fragmentación de ADN que hace que por seleccionar a los mas móviles se elijan indirectamente a los de ADN menos fragmentado. En un experimento *in vitro*, hemos analizado si existe una correlación entre motilidad y fragmentación del ADN. Analizamos la fragmentación del ADN mediante la técnica de COMET en espermatozoides que habían sido seleccionados *in vitro* por su alta motilidad encontrando una gran correlación entre motilidad y bajos niveles de fragmentación en el ADN (datos no publicados). Otros autores han sugerido también esta correlación motilidad-integridad del ADN mediante aproximaciones *ex vivo* o *in vitro* (Huang et al., 2005; Ramos and Wetzels, 2001). Sin embargo, nuestro experimento de fecundación *in vivo* con espermatozoides procedentes de machos radiados produjo un número muy alto de reabsorciones, indicándonos que el espermatozoide procedente de machos sometidos a este tratamiento es portador de daño en el ADN (mutaciones.etc.) que es identificado por COMET y que no son seleccionados por el tracto reproductivo femenino. Se ha demostrado que las reabsorciones embrionarias están ligadas a alteraciones en el ADN que no pueden ser reparadas, pero que no impiden la fecundación por lo que en este caso se manifiestan en fases posteriores de la gestación. En conjunto, todos estos datos apoyan la idea de que existe una relación entre motilidad y daño en ADN portado por el espermatozoide cuando éste es generado de una forma directa sobre las cadenas que lo conforman o de forma indirecta por

elementos como son RLO que pueden afectar tanto a la integridad del ADN como a otras organelas importantes para la motilidad, como las mitocondrias. Pero esta correlación no es extensible a las mutaciones y alteraciones puntuales que sobre la estructura básica del ADN se hayan podido ocasionar (crosslinking entre pares de bases, sitiosapurínicos o apirimidínicos) como por ejemplo resultado de radiaciones ionizantes.

Para analizar si tanto el anclaje como la penetración de los espermatozoides en la ZP juegan un papel importante en la selección de espermatozoides con ADN fragmentado o no, nosotros examinamos la calidad del ADN de los espermatozoides anclados a ZP así como el desarrollo preimplantacional de embriones obtenidos mediante FIV e ICSI utilizando espermatozoides procedentes de los grupos control, estrés térmico escrotal y radiación gamma. El análisis de los espermatozoides procedente de machos tratados y anclados a ZP mostró que éstos tenían un nivel de fragmentación del ADN menor que los espermatozoides que no se anclaron, indicando que la ZP ejerce una fenómeno de selección positiva frente a ADN no fragmentado, o que el esperma motil (con un nivel bajo de fragmentación de ADN) tiene una capacidad mayor de unirse a ZP. Esta fenomenología está de acuerdo con lo descrito anteriormente por (Liu and Baker, 2007), quienes demostraron que un alto número de espermatozoides con cromatina no alterada eran capaces de anclarse a ZP.

Las muestras tomadas de la gota de fecundación, pusieron de manifiesto un incremento en los niveles de fragmentación de estos espermatozoides comparado con los recolectados del epidídimo tanto de los grupos control como radiado (datos no mostrados). Este hecho podría estar relacionado con la presencia de endonucleasas liberadas por espermatozoides muertos (Shaman et al., 2006; Sotolongo et al., 2005; Sotolongo et al., 2003) que actuarían durante la FIV. Algunos autores han sugerido que la membrana alterada de algunos espermatozoides podrían liberar sustancias al medio, incluyendo endonucleasas, que fragmentarían el ADN de espermatozoides que no tendrían por qué tener alterada su membrana (Perez-Crespo et al., 2008a). También podría tener lugar un incremento en la producción de radicales libres de oxígeno (RLO) durante la FIV podría tener lugar, incrementando el daño en espermatozoides vivos (Enkhmaa et al., 2008). De hecho, los experimentos de FIV demostraron que los espermatozoides procedentes de machos tratados térmicamente eran capaces de fecundar y de producir blastocistos en la misma proporción que los machos controles, pero cuando este mismo esperma se utilizaba en ICSI, los cigotos no se desarrollaban hasta blastocisto en la misma proporción que el control, indicando la capacidad de la ZP para seleccionar espermatozoide con menor fragmentación de ADN. En el caso de espermatozoides procedentes de ratones radiados, el desarrollo a blastocisto se redujo en comparación con el grupo control independientemente de que se utilizara FIV o ICSI, indicando que la ZP no es capaz de seleccionar los espermatozoides en cuanto a su integridad de ADN cuando la fuente de daño es la radiación ionizante. Estos hallazgos coinciden plenamente con nuestros resultados *in vivo* porque muchos de estos blastocistos pudieron implantarse pero no tuvieron un desarrollo fetal normal, terminando por ser reabsorbidos. En cambio las

gestaciones obtenidas *in vivo* mediante monta con ratones estresados térmicamente indican que los blastocistos resultantes son tan competentes como los blastocistos control para dar lugar a fetos vivos. A diferencia de otros estudios en los que encontraron un bloqueo en el desarrollo embrionario utilizando machos estresados térmicamente (Paul et al., 2008b), nosotros no observamos esta paralización posiblemente consecuencia del diferente fondo genético del macho, CD1 en nuestro caso frente a C57Bl/6 usado por Catriona Paul (Paul et al., 2008b; Paul et al., 2009). Está comprobado que el fondo genético de estirpes consanguíneas y no consanguíneas de ratón afecta a los parámetros espermáticos, a la resistencia y susceptibilidad a la fragmentación del ADN, a la tasa de fecundación *in vitro* y al desarrollo embrionario *in vitro*; además, los espermatozoides del fondo genético C57BL/6 son particularmente sensibles (Yildiz et al., 2007). Por esta razón, los resultados obtenidos con esta estirpe consanguínea deben ser tenidos en cuenta con cautela.

Nuestros resultados indicaron que cuando la monta tiene lugar después de la ovulación, el tracto reproductor femenino y la ZP a través del anclaje y/o penetración juegan un papel importante no sólo en la selección de los espermatozoides con motilidad dentro de los valores normales y morfología óptima sino también con alta integridad de ADN. Esta selección a favor de ADN íntegro en el tracto reproductivo femenino y en el anclaje a ZP es consecuencia directa de la alta correlación existente entre motilidad y alta integridad de ADN (óptima calidad de la cromatina). Además existe un mecanismo activo de selección para ADN no fragmentado portado por el espermatozoide que tiene lugar durante la penetración de la ZP. Sin embargo este mecanismo es incapaz de reconocer algunas de las anormalidades presentes en el ADN del espermatozoide como es el caso de las mutaciones originadas por radiación. Esto nos sugiere la posibilidad de que durante el estrés térmico, y no durante la radiación, ocurran otras alteraciones a la vez que la fragmentación y que sean estas otras alteraciones las que son reconocidas bien por suponer cambios en el fenotipo de los espermatozoides y en la función asociados a estas alteraciones.

Si los mecanismos de selección que operan en la naturaleza son capaces de discriminar la calidad de los espermatozoides, entender las bases de los mecanismos de selección impuestos por la naturaleza podría clarificar cual de los test de laboratorio existentes para la determinación de la fertilidad es más eficiente. Esto es de crucial importancia en ciertas situaciones, como por ejemplo cuando los tratamientos con ICSI son los elegidos como técnica de reproducción asistida, ya que la ICSI sobrepasa las barreras naturales de la fecundación, aparentemente redundantes y que podrían estar asegurándose la selección de aquellos espermatozoides con mayor calidad para la fecundación. La fragmentación del ADN parece afectar al embrión en términos postimplantacionales cuando se analizan aquellos procedimientos en los que se ha realizado ICSI en humanos, resultando muchos de ellos en pérdidas embrionarias (Borini et al., 2006). Nuestro resultado sugiere de forma contundente que FIV es una técnica preferente a la ICSI y que ICSI debería ser realizada con

espermatozoides móviles para reducir los efectos de la utilización de espermatozoides con ADN fragmentado.

CAPÍTULO II

RECUPERACIÓN DE LÍNEAS MURINAS: COMPARACIÓN DE PROTOCOLOS DE CONGELACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE FECUNDACIÓN *IN VITRO* E INSEMINACIÓN ARTIFICIAL INTRAVIDUCTAL CON ESPERMATOZOIDES CONGELADOS.

RESUMEN

La criopreservación de espermatozoides es una técnica que permite la creación de archivos de líneas murinas mutantes a partir de un número sensiblemente menor de animales que los utilizados para congelar embriones y con mayor rapidez y con unos menores costes económicos y de espacio de almacenamiento. Sin embargo lejos de haber protocolos perfectamente estandarizados, hay una gran variabilidad en los resultados. En este trabajo, se han comparado diferentes metodologías con el objeto de definir un método optimizado. Concretamente, se ha perseguido evaluar la combinación de determinadas mezclas crioprotectoras (rafinosa-leche Descremada, RL; yema de huevo-glicerol-rafinosa, HG) con rampas de descenso térmico ($-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$) que favoreciesen la acción de los mismos. Nuestro principal objetivo ha sido mejorar la congelación de la estirpe C57Bl/6 fondo genético actualmente utilizado como fondo de referencia en la mayoría de líneas transgénicas y que se caracteriza por una especial criosensibilidad. Los análisis funcionales que se realizaron posteriormente a la descongelación mostraron que los espermatozoides de la estirpe C57Bl/6 presentan una integridad de membrana significativamente menor que el de los espermatozoides sin congelar. También la motilidad post descongelación se vio significativamente afectada, independientemente de la rampa de congelación, o crioprotector utilizado. En paralelo, el esperma de los ratones híbridos utilizados como control, B6CBAF1, también mostró un descenso significativo de las poblaciones móviles con respecto al esperma fresco, pero los valores de motilidad post-descongelación fueron claramente superiores que los observados en la estirpe C57Bl/6. Al analizar la integridad acrosomal ninguno de los protocolos de congelación utilizados ensayados en la estirpe C57Bl/6 mostró que afectara significativamente a esta vesícula, análogamente a lo que sucedía en la estirpe control.

Para confirmar la utilidad de todas la pruebas de contrastación se realizaron fecundaciones *in vitro* (FIV) con objeto de establecer la capacidad fecundante real de los espermatozoides congelados. En el caso del fondo genético control durante la FIV se obtuvieron porcentajes de fecundación cercanos a los obtenidos con espermatozoides frescos, confirmando los resultados aportados sobre este tipo de estirpes por otros autores (Tada et al., 1990). Ninguno de los protocolos de congelación utilizados en los espermatozoides de C57Bl/6 demostró una clara ventaja durante la fecundación.

La batería de contrastación empleada tradicionalmente en la evaluación funcional de los espermatozoides frescos, motilidad, integridad del acrosoma o de la membrana, no pusieron de manifiesto diferencias que pudieran justificar la criosensibilidad de la estirpe C57Bl/6. Por esta razón se realizó un estudio de otro carácter al que se le está prestando una atención creciente como sistema de medida de calidad espermática, la integridad del ADN. Este parámetro se analizó mediante dos procedimientos, TUNEL y SCGE. Nuestro estudio constató que existe un daño en los “lazos” que forma el ADN compactado en el núcleo de la célula, poblacionalmente más acusado en la estirpe C57Bl/6 que en el fondo B6CBAF1; pero estos

valores no fueron lo suficientemente altos como para atribuirles un efecto negativo sobre la fecundación o la congelabilidad, como inicialmente habíamos supuesto.

Ante la imposibilidad de aumentar la viabilidad post descongelación de espermatozoides de forma significativa con las modificaciones técnicas utilizadas, exploramos la posibilidad de aumentar la eficiencia del esperma congelado apoyándonos en los resultados de estudios previos, presentados en el capítulo experimental de esta memoria. La capacidad de selección del tracto genital de la hembra nos sugirió la posibilidad de realizar inseminación artificial intraoviductal. Esta técnica permitiría facilitar la llegada de los espermatozoides a la zona de fecundación y posibilitaría la selección de aquellos espermatozoides con mayor capacidad fecundante. Este abordaje permitió aumentar los datos de fecundación, pero no lo suficiente como para compensar el esfuerzo técnico necesario para llevarla cabo. Sólo será recomendada en aquellos casos en los que otras técnicas con mayor eficiencia, en particular la (ICSI) son inaccesibles desde el punto de vista técnico, personal o material.

INTRODUCCIÓN

La principal aplicación de la criopreservación en la gestión de líneas murinas transgénicas es la conservación a largo plazo de las mismas, evitando riesgos sanitarios, modificaciones debidas a la deriva genética y liberando espacio de las instalaciones dedicadas al mantenimiento de animales vivos. Obviamente, la conservación de estos recursos puede realizarse desde diferentes abordajes. Históricamente se ha recurrido fundamentalmente a la conservación de embriones, y sólo recientemente la criopreservación de esperma está adquiriendo un papel más destacado.

La congelación de esperma de ratón es relativamente simple y no requiere de equipamiento especial ni sofisticado. Sin embargo para ser una técnica plenamente utilizable, los espermatozoides deben ser capaces de congelarse, recuperando la mayoría de sus funciones en la descongelación y, además, el personal técnico debe manejar correctamente tanto las técnicas de congelación como los procedimientos de fecundación *in vitro* (FIV) u otros para recuperar las líneas.

Normalmente las líneas genéticamente modificadas son establecidas en el fondo genético C57Bl/6, un fondo genético que se caracteriza por una especial criosensibilidad de los espermatozoides lo que implica una congelabilidad muy baja. Se han descrito hasta la fecha diferentes protocolos de congelación que aumenta la eficiencia (Liu et al., 2009; Movassaghi et al., 2009; Taguma et al., 2009; Takeo et al., 2008) del procedimiento. Sin embargo, tanto las diferencias morfológicas con otras especies, como la diferente composición lipídica (Darin-Bennett and White, 1977; Hammerstedt et al., 1990; Parks and Graham, 1992; Parks and Lynch, 1992) o la propia fragilidad del espermatozoide murino (Katkov and Mazur, 1998) no han permitido obtener resultados plenamente satisfactorios. En algunos casos, como en el de los fondos híbridos, los resultados de congelación no son buenos en valores absolutos pero una pequeña población de los espermatozoides congelados presentan una motilidad óptima a la descongelación que permiten obtener altos porcentajes de fecundación (>90%) (Sztein et al., 1997) en procesos de fecundación *in vitro*.

Por lo tanto, en el caso del espermatozoide murino es más correcto señalar que, las diferencias en congelabilidad entre estirpes radica, en parte, en el número de espermatozoides móviles recuperados después de la descongelación ((Krzanowska et al., 1995; Williams et al., 1970); Sin embargo, este análisis apenas se encuentra documentado en la bibliografía. Tada, en 1990, realizó un estudio en el que utilizando una mezcla crioprotectora con un 1,75% de glicerol y 18% de rafinosa comprobaba, con diferencias significativas, el diferente comportamiento de los espermatozoides no congelados, pero no quedaba suficientemente claro que esas diferencias se trasladasen a los espermatozoides congelados de las diferentes estirpes seleccionadas para el estudio. Songsasen y Leibo (1997) realizaron un estudio en el que el esperma de la estirpe B6D2, tras congelación-descongelación, presentaba un porcentaje

de fecundación (FIV) del 61%(Songsasen et al., 1997); como era previsible para un fondo híbrido, el porcentaje se encontraba dentro de los valores adecuados para una correcta recuperación de la línea. Por otra parte, las estirpes consanguíneas analizadas, C57Bl/6 y 129/J, apenas llegaron a fecundar un 3% y un 17%, respectivamente. Por tanto, la necesidad de implementar nuevos protocolos de congelación para la estirpe C57Bl/6 es aún patente.

Recientemente se han propuesto nuevas medidas para incrementar la tasa de fecundación de espermatozoides congelados de C57Bl/6. Diferentes estudios han descrito la incapacidad para sufrir el proceso de capacitación por parte de los espermatozoides de esta estirpe (Takeo et al., 2008). La incorporación de moléculas con capacidad secuestrante de colesterol, facilitarían el desencadenamiento de la cascada de capacitación, favoreciendo la fecundación (Choi and Toyoda, 1998). La incorporación de estas sustancias bien en el medio de congelación (Liu et al., 2009; Ostermeier et al., 2008) bien en el medio de descongelación (Taguma et al., 2009; Takeo et al., 2008) ha abierto una puerta a la resolución del problema que se mantiene en los repositorios de líneas transgénicas, pero todavía estamos lejos de disponer de un protocolo universal que garantice los resultados, incluso con las mejoras descritas basadas en diferentes aditivos, hay diversidad de resultados y, en el mejor de los casos, sólo permiten optimizar la congelación de las nuevas estirpes, no las ya criopreservadas. En estas la calidad de las muestras es cuestionable y requiere de un esfuerzo adicional para su recuperación.

Por esta razón la implementación de nuevos protocolos debe centrarse no sólo en el diseño de mejores crioprotectores sino también mejores sistemas de descongelación que faciliten la capacitación y por tanto, favorezcan la fecundación. En ese sentido, el trabajo que aquí se presenta, no sólo se comparan los métodos de congelación para espermatozoides de ratón más ampliamente utilizados, sino también explora por primera vez una alternativa, completamente *in vivo* (fisiológica) por la que el espermatozoide congelado de ratón es capaz de ser seleccionado y capacitado en condiciones naturales dentro del tracto reproductor de la hembra, mejorando las tasas de fecundación obtenidas hasta el momento mediante técnicas de reproducción asistida como la fecundación *in vitro*.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Parte A. Congelación de espermatozoides de ratón procedente de las estirpes C57Bl/6 y B6CBAF1 utilizando 2 mezclas crioprotectoras y 2 rampas de congelación. Comparación entre protocolos.

Para llevar a cabo una comparación en la eficiencia de congelación de las estirpes de ratón C57Bl/6 y B6CBAF1 realizamos un diseño experimental de tal forma que cada muestra de espermatozoides fuese sometida a las 2 mezclas crioprotectoras y 2 rampas de congelación. Para ello, en cada ronda de congelación, 2 machos (8 semanas de edad) de cada estirpe se seleccionaron al azar, se sacrificaron mediante dislocación cervical y aislando los epidídimos de ambos. Estos epidídimos fueron repartidos 2 a 2 en los 2 protocolos de congelación establecidos, de forma que de cada par de epidídimos se pudiesen congelar espermatozoides en las 2 rampas de congelación previstas (Fig. 10)

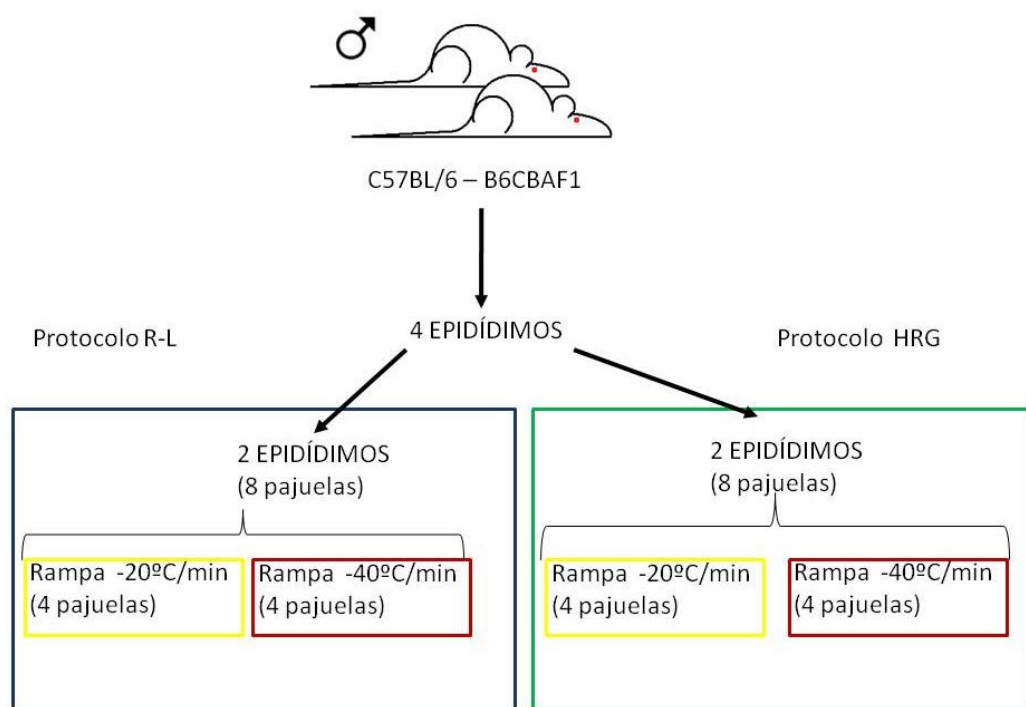


Fig. 10 Esquema del diseño experimental seguido para el desarrollo de la primera parte de este capítulo. Sistema empleado para la obtención de muestras, procesado y congelación de las mismas.

Una vez contrastada la calidad espermática de ambos machos, las muestras seminales fueron congeladas, almacenadas durante 15 días y posteriormente descongeladas y analizadas. Con el fin de evaluar la eficiencia del procedimiento de congelación las muestras espermáticas descongeladas fueron sometidas a una batería de contrastación. Esta batería constaba de análisis de motilidad progresiva, análisis de integridad de membrana y análisis de integridad acrosomal.

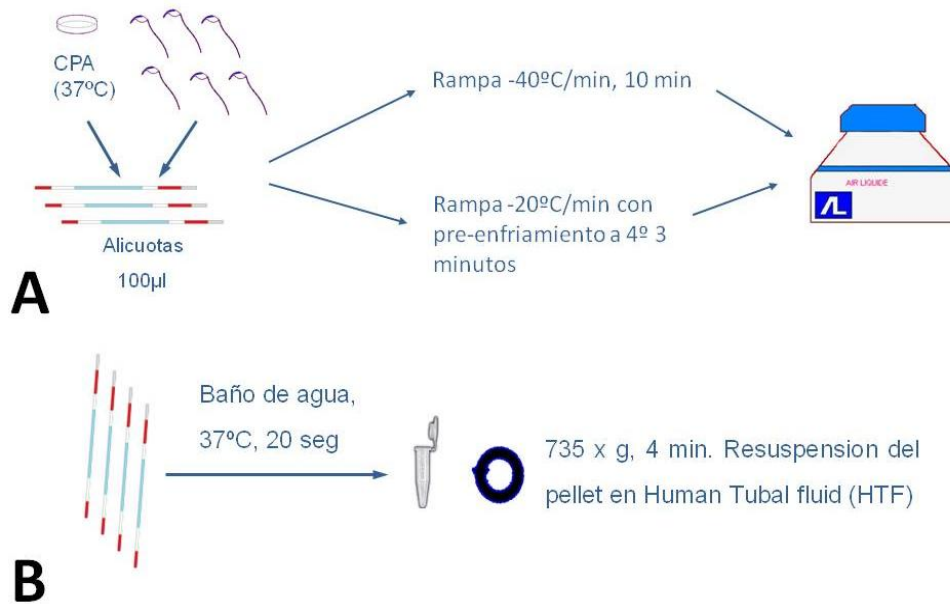


Fig. 11 Esquema de los procesos de congelación (A) y descongelación (B) llevados a cabo durante el desarrollo experimental de este capítulo.

Parte B. Análisis de la eficiencia de la congelación de espermatozoides mediante la utilización de la fecundación in vitro.

Se realizó una evaluación de las muestras de espermatozoides fresco (pre-congelación) como tras la descongelación y se complementó con una prueba de fecundación *in vitro*. A través de esta técnica se constata la capacidad funcional de los espermatozoides objeto de análisis, estableciéndose la posibilidad de ser utilizados para recuperar la línea correspondiente.

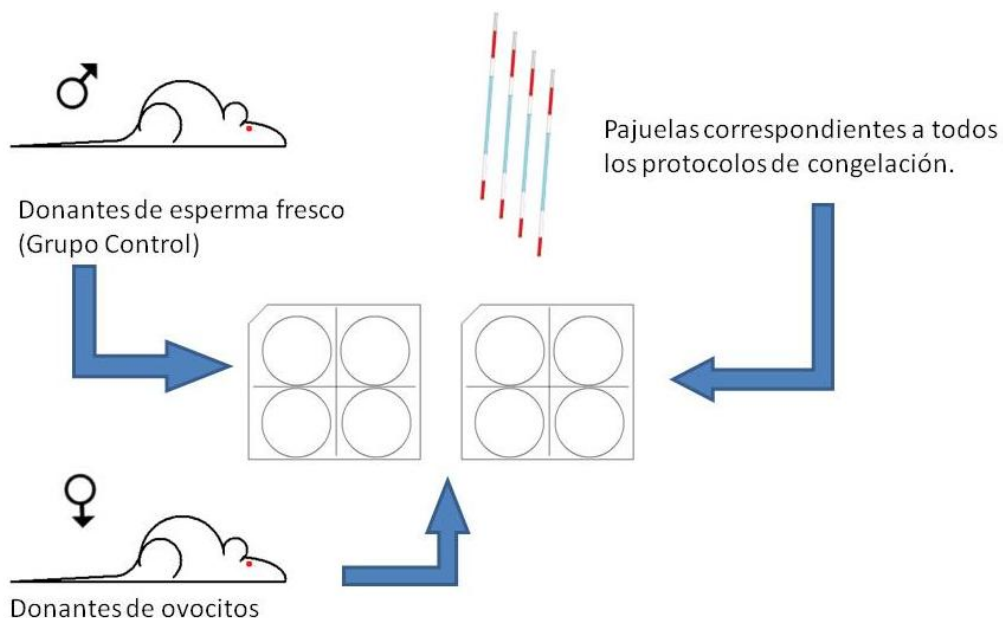


Fig. 12 Esquema de fecundación *in vitro*

Parte C. Análisis de la fragmentación de ADN espermático. Análisis de un marcador molecular de fertilidad.

En este trabajo se ha introducido, como novedad, el análisis de la fragmentación de ADN para muestras seminales procedentes de stocks congelados. Este análisis permite evaluar el impacto del procedimiento de congelación sobre la integridad del ADN espermático, y por tanto comprobar la influencia de este parámetro sobre la fecundación y posterior desarrollo pre-implantacional y post-implantacional de los embriones obtenidos.

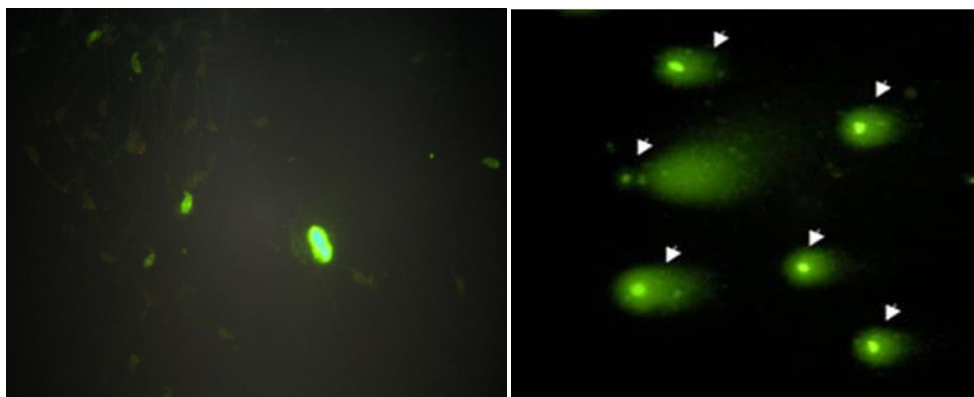


Fig. 13 Imágenes representativas de A) espermatozoides TUNEL positivos (flecha) y B) espermatozoides sobre los que se ha realizado COMET (flechas) para analizar la fragmentación de ADN

Parte D. Utilización de la inseminación artificial intraoviductal como forma de recuperación de una línea murina a través del uso de espermatozoides congelados. Influencia de los fenómenos de selección espermática in vivo como filtro durante la fecundación.

Con el fin de explorar nuevas técnicas que permitiesen mejorar las tasas de fecundación que se consiguen con espermatozoides congelados de la estirpe C57Bl/6, planteamos la realización de una fecundación *in vivo* mediante inseminación con espermatozoides descongelados. Escogimos este abordaje basándonos en los resultados obtenidos en el capítulo anterior. La hipótesis es que si el tracto femenino es capaz de seleccionar el espermatozoide no dañado (motil y con ADN integro) haciendo que llegue preferencialmente a la zona de fecundación, esta misma capacidad de selección se podría ejercer en el espermatozoide congelado y depositado en el oviducto (inseminación oviductal) podría ser seleccionado en función de esos mismos parámetros (motilidad e integridad de ADN) mejorando los resultados obtenidos mediante fecundación *in vitro*.

Para el desarrollo de este abordaje experimental fue necesario establecer previamente una serie de parámetros. Comparando las dos estirpes de ratón utilizadas de forma constante en nuestro protocolo experimental, se valoró por una parte cuál es la dosis óptima para realizar una inseminación eficiente y cuál es la combinación de espermatozoide y ovocito más adecuada para llevar a cabo una inseminación con objeto de recuperar una línea transgénica o mutante. Una vez optimizado el protocolo para evaluar la incidencia del mismo en la fertilidad

con espermatozoides descongelados se utilizaron dosis de espermatozoides de ratón C57Bl/6 congeladas mediante el protocolo RL -40°C/min

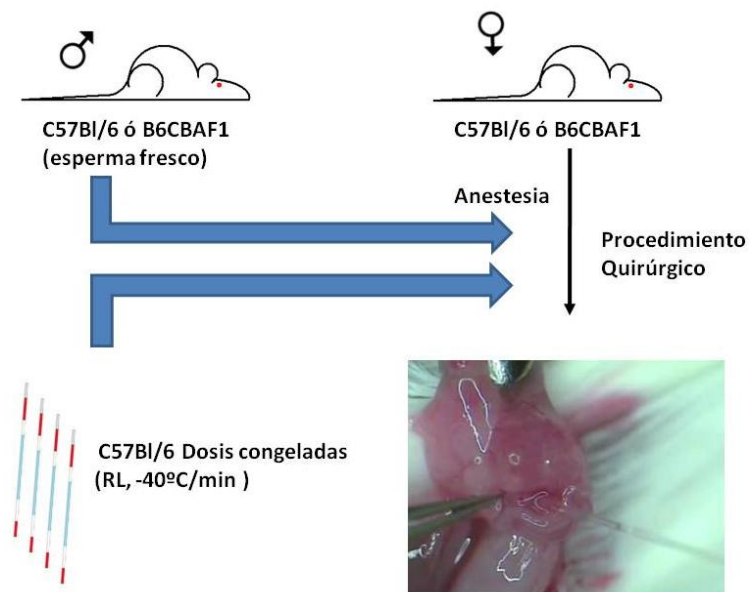


Fig. 14 Esquema para los procedimientos de inseminación llevados a cabo durante el desarrollo experimental de este trabajo.

MATERIAL Y MÉTODOS

ANIMALES

Se utilizaron 2 estirpes distintas, la estirpe consanguínea C57Bl/6 y la estirpe híbrida B6CBAF1 obtenidas de núcleos de cría alojados en las instalaciones del animalario del Dpto. de Reproducción Animal del INIA. Los progenitores se adquirieron a Harlan (Harlan Ibérica, Barcelona, España). Los machos B6CBAF1 utilizados en el experimento se obtuvieron del cruce de hembras C57Bl/6 con machos CBA. Los machos donantes de esperma fueron utilizados con una edad comprendida entre las 12 y 15 semanas de edad, Las hembras utilizadas para la obtención de ovocitos o los experimentos de inseminación artificial contaban con 8 - 10 semanas de edad, Todos los animales se mantuvieron en condiciones controladas de luz (14 h de luz y 10 h de oscuridad), temperatura (22°-24°C) y humedad (50-60% de humedad) en las instalaciones del animalario del Dpto. de Reproducción Animal del INIA.

CRIOPROTECTORES

En este estudio se han utilizado dos tipos de mezclas crioprotectoras. La primera solución se preparó de acuerdo con el protocolo descrito en (Nakagata, 2000). Brevemente, una mezcla de rafinosa al 18% (p/v) y leche descremada al 3% (p/v) fueron disueltas en agua destilada a 60°C. Esta solución fue centrifugada a 10000g durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de 0,22 µm de poro (Millipore, Carrighwahill, Cork, Irlanda). La solución filtrada fue almacenada a -20°C en alícuotas en tubos tipo eppendorf. Cada alícuota fue descongelada y atemperada a 37°C previamente a su utilización.

La segunda solución crioprotectora se preparó de acuerdo con Songsasen y Leibo, (1997). Esta mezcla (Songsasen and Leibo, 1997a; Songsasen and Leibo, 1997b) contiene rafinosa 0,45 M y glicerol 0,3 M. Para su preparación se tomaron 12 ml de D-PBS que fueron mezclados con 4 ml de yema de huevo y 16 mg de SDS. Los componentes se mezclaron bien y se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo, la solución se centrifugó a 8800g durante 30 min. El sobrenadante se recolectó disolviéndose en él la rafinosa. Una vez disuelta, la mezcla fue filtrada a través de un filtro de 0,22 µm. Finalmente, para completar la composición de la mezcla, se añadió el volumen necesario de glicerol estéril para obtener la proporción adecuada. La presión osmótica de la mezcla oscila entre 1500-1700 mOsm. La mezcla crioprotectora se atemperó durante la noche a 37°C y se utilizó en los dos días siguientes.

PROCESO DE CONGELACIÓN Y DESDESCONGELACIÓN

Para evitar las diferencias individuales que pueden aparecer entre machos, en cada ronda de congelación se sacrificaron dos animales, aislándose cuatro vasos deferentes y sus correspondientes epidídimos (cada muestra) que se distribuyeron en los dos protocolos de congelación, rafinosa-leche descremada (RL) y yema-rafinosa-glicerol (HG). De tal forma que cada protocolo recibiera un epidídimo de cada macho. Una vez eliminados los tejidos

accesorios, grasa y vasos sanguíneos en PBS, se transfieren los epidídimos a una placa de 35 mm conteniendo 1 ml de crioprotector (CP) en el caso del protocolo para RL o 350 µl de D-PBS en el caso del protocolo de HG, precalentado a 37°C. Cada vaso deferente fue comprimido a lo largo de toda su longitud para recolectar los espermatozoides de su interior. Tanto el CP como el D-PBS, fueron incubados 10 min con agitación a 37°C favoreciendo la dispersión de la masa espermática.

Después de la incubación, los espermatozoides que fueron directamente recolectados sobre el crioprotector de refinosa-leche descremada (RL), se empajuelaron en pajuelas de 0,25 mm con un volumen aproximado de esperma por pajuela de 100 µl,

En el caso de los espermatozoides recolectados en D-PBS, se añadieron 700 µl de crioprotector HG, aplicado en tres alícuotas de 200 µl y una única de 100 µl (Songsasen and Leibo, 1997a; Songsasen and Leibo, 1997b) cada 10-20 s con el objeto de minimizar el impacto osmótico al que se someten los espermatozoides en presencia de este crioprotector.

El proceso de congelación se realizó en una caja de estirofoam con unas medidas adecuadas: 25 cm de longitud, 15 cm de ancho y 15 cm de profundidad. La caja se llenó hasta 5 cm por encima del fondo con nitrógeno líquido (LN₂). Las pajuelas fueron puestas sobre diferentes piezas de estirofoam flotando sobre el nitrógeno líquido en función de la rampa de enfriamiento que se buscaba. Para una curva de congelación de -20°C/min, las pajuelas fueron enfriadas en un baño de hielo hasta -3°C pasando a la caja de congelación con una altura sobre el nitrógeno de 5 cm durante 5 min, de allí pasaron directamente al nitrógeno líquido. Para una curva de congelación de -40°C/min, las pajuelas fueron puestas directamente sobre la pieza de estirofoam a una distancia del nitrógeno de 2,5 cm. Cada curva de congelación fue determinada previamente al momento experimental acoplado un termopar a las pajuelas.

El procedimiento de descongelación difiere en función de crioprotector aplicado. Para el crioprotector basado en RL, las pajuelas fueron transferidas directamente desde el nitrógeno líquido a un baño de agua a 37°C durante 20 segundos hasta ver que el hielo desaparecía. El contenido de las pajuelas fue expelido en un tubo eppendorf con 400 µl de medio HTF. En el caso del crioprotector basado en HG, al contenido de la pajuela descongelado, se le añaden alícuotas de 200 µl de D-BS cada 10 segundos (600 µl de volumen final), permitiendo así la recuperación del volumen espermático minimizando el choque osmótico

ANÁLISIS ESPERMÁTICO

El análisis se realizó partiendo de alícuotas procedentes de espermatozoides epididimarios justo antes de su congelación y posteriormente a su descongelación. De esta manera se evaluó la eficiencia del proceso de congelación así como de los crioprotectores empleados. El espermatozoide descongelado se dejó en un volumen de unos 60 µl de HTF para realizar un swim-up durante 15 min posteriores a la descongelación.

MOTILIDAD PROGRESIVA

Fue determinada utilizando el sistema integrado de análisis espermático (ISAS, Projects i Serveis R+D SL, Valencia, Spain). El número de espermatozoides motiles y no motiles fue cuantificado haciendo una valoración de al menos 3 campos con un mínimo de 200 espermatozoides.

INTEGRIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA.

La integridad de la membrana plasmática fue determinada por la tinción fluorescente de viabilidad espermática creada por Roche (Live/Dead Sperm Viability Kit, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). De acuerdo a las normas del fabricante, 10 µl de espermatozoide (descongelado o fresco) fue incubado en 50 µl de solución de incubación (130 mM NaCl, 4 mM KCl; 14 mM fructosa, 10 mM HEPES, 1.35 mM CaCl₂, 1.05 mM MgCl₂, 0.1% (w/v) BSA, pH 7.4), 1,2 µl de Ioduro de propidio y 0,9 µl de SybrGreen, durante 15 min a 37°C. Pasado ese tiempo, los espermatozoides fueron fijados en 4% de paraformaldehído. Una alícuota de 10 µl de espermatozoide procedente de citada mezcla fue puesta en un portaobjetos, cubierta por un cubreobjetos y observada en un microscopio de epifluorescencia (Optiphot, Nikon, USA) utilizando como filtro de excitación un paso de 400-440 nm, espejo dicróico 455 LP y filtro de barrera 470 nm. Al menos 200 espermatozoides se contaron como población representativa de la muestra.

INTEGRIDAD ACROSOMAL

La integridad del acrosoma fue analizada mediante microscopia de contraste de fases. El espermatozoide fue fijado en glutaraldehído al 2% en PBS. Al menos 200 espermatozoides fueron evaluados en cada muestra.

ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

TUNEL

Alícuotas gelificadas de 1% de agarosa de bajo punto de fusión se licuaron en baño de agua caliente a 90°C-100°C durante 5 min hasta la completa fusión de la agarosa. Posteriormente se transfirieron a un baño de agua a 37°C; después de 5 min de incubación a 37°C, 30 µl de la muestra fueron mezclados con agarosa (concentración final 0,7%). Se aplicaron 20 µl de la mezcla de espermatozoides-agarosa sobre un portaobjetos pre-cubierto con 0,65% de agarosa de punto de fusión normal (deshidratada a 80°C) y cubierto con un cubreobjetos de 22x22 mm.

Cada portaobjetos fue refrigerado por espacio de 5 minutos para permitir la formación de un microgel con los espermatozoides atrapados en su interior. Los cubreobjetos fueron eliminados y sumergidos rápidamente en 10 ml de una solución que contenía 4% de β -mercaptoetanol (Sigma, St Louis, MO) y 0,05% de Triton X-100 disuelto en PBS, para eliminar membranas y reducir los puentes disulfuro de las protaminas (-SS a -SH). Después de lavar durante 5 minutos con PBS, se indujo un choque osmótico colocando los portaobjetos con sus correspondientes muestras en una solución 1M de NaCl durante 3 min. Después de lavados adicionales de 5 min de duración, las muestras fueron colocadas en un baño de formaldehído al 4% durante 30 min. Se analizaron las roturas simples y dobles en la hebra de ADN mediante la utilización de la reacción de la enzima TdT y dUTP marcados con una sonda fluorescente (fluoresceína isotiocianato, FITC). La reacción denominada TUNEL (TdT-mediated-dUTP nick end labelling) se detalla en el esquema (Fig. 16) y fue llevada a cabo utilizando el kit de Situ Cell Death Detection Kit (Roche, Alemania) como se ha descrito en otras publicaciones (Sasso-Cerri and Miraglia, 2002).

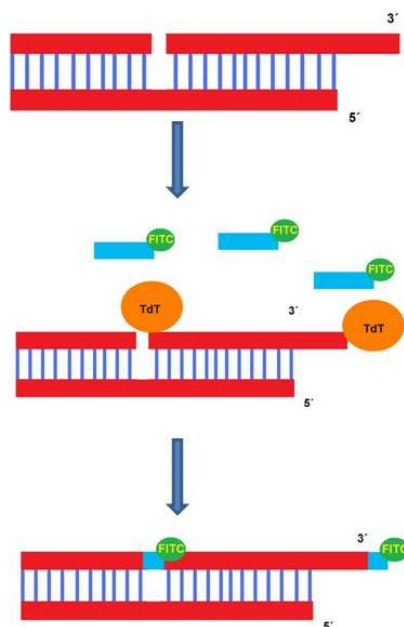


Fig. 15 Esquema de reacción de incorporación de nucleótidos marcados con FITC en las zonas de rotura dentro de una doble hebra de ADN

Los portaobjetos fueron lavados en PBS dos veces y contrateñidos con 2 μ g/ml de 4,6 diamidino-2-fenilindol (DAPI) en Vectashield (Vector, Burlingame, CA, EEUU) Los controles negativos carecían de la enzima TdT y se utilizó un control por cada replica. Se valoraron como mínimo 500 espermatozoides por tratamiento analizándolos mediante microscopia de fluorescencia (Nikon, Japón). El número total de espermatozoides fue estimado contando el número de espermatozoides teñidos con DAPI (azul) y el número de espermatozoides con roturas en su ADN fue determinado por la presencia de fluorescencia verde en su interior (TUNEL positivos).

SCGE

Una alícuota de una suspensión de espermatozoides en PBS (60 µl) fue mezclada con agarosa de bajo punto de fusión (1% w/v). Un volumen de 100 µl de esta preparación fue aplicada sobre la superficie de portaobjetos precubiertos (1% de agarosa de punto de fusión normal, deshidratados), que luego se cubrieron con un cubreobjetos (tamaño 24x60 mm) dejándose solidificar durante 30 min a 4°C. Posteriormente, los cubreobjetos fueron retirados y los portaobjetos sumergidos en solución de lisis (Trevigen Inc, Gaithersburg, MD, EEUU) suplementado con ditioneitol (DTT, 40 mM, Sigma) y Proteinasa K (200 µg/ml, Sigma) durante 90 minutos a 37°C y protegidos de la luz. Tras la lisis, los portaobjetos fueron lavados en tampón de electroforesis (TBE, 50 mM TRIS, 50 mM Borato sódico, 1 mM, Sigma) durante 5 min. Las muestras fueron colocadas en una unidad de electroforesis horizontal (www.biocomdirect.com) y equilibradas durante 20 min con TBE antes de la electroforesis (25V, 300 mA) durante 7 min. Una vez concluida la electroforesis, las muestras fueron neutralizadas en Tris-HCl durante 5 min, aclaradas en agua y secadas al aire. Se guardaron protegidas de la luz hasta el análisis.

PROCESO DE ANÁLISIS EN SCGE

Los microgeles fueron teñidos con SYBR como fluoróforo (dilución 1:10000; Molecular Probes). Las células fueron visualizadas con a 200 aumentos utilizando un microscopio de epifluorescencia (Optiphot 2; Nikon, Tokyo, Japan). El análisis de imagen cuantitativo se realizó utilizando una cámara CCD (Nikon Coolpix S5000, Nikon, Tokyo, Japan) acoplada al microscopio. Las fotografías fueron tomadas y modificadas utilizando un software gratuito. Posteriormente las imágenes fueron analizadas con el software para COMET llamado CometScore (TriTek Inc. Northern Virginia, Washington DC, EEUU). 100 células fueron seleccionadas al azar en cada portaobjetos. Los parámetros analizados fueron: longitud de cola, porcentaje de ADN en cola y momento de cola. La longitud de cola es la distancia que migran en presencia de un campo eléctrico los fragmentos de ADN rotos desde el centro o “core” nuclear. El porcentaje de ADN en cola, es la cantidad de ADN que hay en la cola procedente del núcleo espermático (ADN roto por tanto). Finalmente, el momento de cola, es el producto de la longitud de cola por el porcentaje de ADN en cola.

FECUNDACION IN VITRO

Para llevar a cabo la fecundación *in vitro* (FIV) se siguió el protocolo descrito por Sztein (Sztein et al., 2000). Hembras maduras B6CBAF1 fueron superovuladas mediante inyección intraperitoneal de 7,5 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG, folligon, Intervet) seguido de 5 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG, Lepori) 48 h más tarde. 14 horas después de la inyección de hCG, las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical, se aislaron los oviductos y se obtuvieron cúmulos mediante escisión del ámpula. Las células de la granulosa fueron dispersadas en presencia de hialuronidasa (300 µg/ml, en medio M2). Entre 20 y 30 ovocitos fueron puestos en cada gota de fecundación. Los espermatozoides fueron incubados

en HTF (suplementado con BSA) durante 30 min a 37°C con 5% de CO₂. Después de la incubación, utilizando una pipeta automática, entre 10 y 15 µl de suspensión de espermatozoides procedente de la parte periférica de la gota de capacitación fueron transferidos a la gota de fecundación. Después de 5 h, parte de los ovocitos fueron lavados 3 veces en HTF y 2 veces más en KSOM antes de ser puestos en cultivo en KSOMaa durante 24 h para analizar la tasa de división (embriones en 2 células). Los cigotos confirmados se dejaron cultivar hasta estadio de blastocisto.

INSEMINACION ARTIFICIAL OVIDUCTAL

Para llevar a cabo las inseminaciones se decidió utilizar un abordaje quirúrgico basado en la misma técnica que se utiliza para transferir embriones a hembras pseudogestantes. En estudios previos realizados se constató que este era el abordaje más consistente en cuanto a datos de fertilidad

Hembras de 6-8 semanas de edad procedentes de las estirpes C57Bl/6 y B6CBAF1 fueron utilizadas durante este procedimiento. Se superovularon con 5 UI de eCG (Folligon, Intervet) seguidas 48 h después de 5 UI de hCG (Lepori). Puesto que las inseminaciones deben realizarse entre 13 y 15 h post hCG, se estableció como horas de inyección las 7 pm, de forma que las hembras pudieran ser inseminadas entre las 8 am y 10 am del día siguiente a la inyección de la hormona hCG. De acuerdo con los estudios de inseminación realizados, el tiempo de inseminación post-hCG es crítico junto con la estirpe de hembra y espermatozoides utilizados (Sato et al., 2002; Sato et al., 2004).

Las hembras fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina-xilacina idéntica a la descrita en el capítulo I de esta memoria e intervenidas quirúrgicamente mediante un abordaje dorsal con una incisión de 1 cm encima de la localización del ovario accediendo directamente a la bolsa ovárica. A través de esta, se localizó la entrada al oviducto (infundíbulo). Tras rasgar la bolsa ovárica, el infundíbulo es inmovilizado. La pipeta de inseminación es cargada con 2 µl de esperma adecuando la dosis. Finalmente, la carga de la pipeta es expelida por el operador. El mismo proceso se repite en el otro oviducto., cerrando por planos y suturando con grapa a nivel de epidermis.

ESTADÍSTICA

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el software SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA). Todos los datos se reflejan en su forma de media ± error estándar. Todas las comparaciones realizadas entre grupos siguieron un análisis de la varianza (ANOVA) con un test post-hoc tipo Student-Knewman-Kleus.

RESULTADOS

EFFECTO DEL CRIOPROTECTOR Y DE LA RAMPA DE CONGELACIÓN SOBRE LOS PARÁMETROS SEMINALES: INTEGRIDAD DE MEMBRANA, INTEGRIDAD ACROSOMAL Y MOTILIDAD POST-DESCONGELACIÓN.

Antes de realizar el procedimiento de congelación, se evaluaba el parámetro correspondiente en fresco. De esta manera se conocía el valor de partida y se podría calcular el descenso en función del crioprotector, rampa y estirpe utilizada en la congelación.

Así, se comprobó que el porcentaje de espermatozoides vivos antes de la congelación es mayor en la estirpe B6CBAF1 que en la estirpe C57Bl/6 (83,1 % vs 55,7%, $p<0,05$). Tras aplicar los protocolos de congelación descritos anteriormente (ver Material y Métodos), el porcentaje de espermatozoides con membrana integra resultó ser de un 45,5% en el caso de espermatozoides de estirpe B6CBAF1 congelados con RL en rampa de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Este fue el mejor porcentaje tras la descongelación, ya que el resto de ellos resultó entre el 29,3% (HG, $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$) y 31,3 % y 37,1 % (HG, $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y RL, $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$). En el caso de espermatozoides procedentes de estirpe C57Bl/6, el porcentaje de células con membrana integra post-descongelación, descendió hasta el 21,9% (RL, $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$) no superando el 27,6% (RL, $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, pero si con el control.

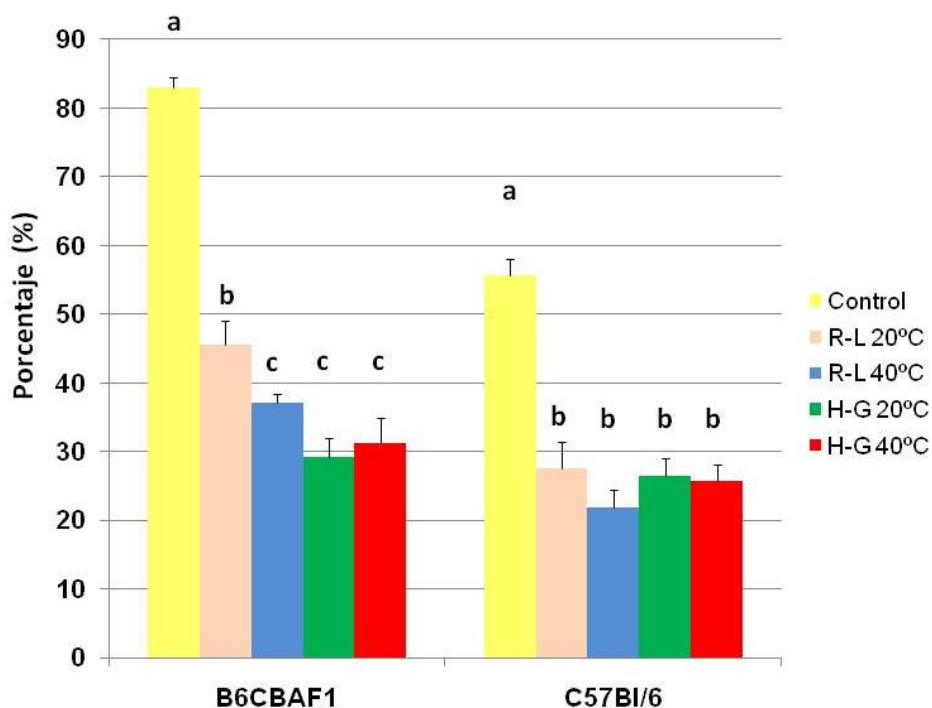


Fig. 16 Porcentaje de espermatozoides con membrana integras (vivos) tras realizarse análisis de la integridad de membrana espermática utilizando el kit Live/Death (ROCHE). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$). Análisis ANOVA comparando tratamientos dentro de una estirpe.

Por lo que se refiere a la motilidad, otro de los parámetros analizados, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva fue de entorno al 79% en el caso de espermatozoides frescos de estirpe B6CBAF1 y del 65% en el caso de C57Bl/6. Los porcentajes de espermatozoides motiles progresivos descendieron tras la descongelación tanto en la estirpe B6CBAF1 como en la estirpe C57Bl/6, siendo más acusados en esta última. En el caso de la estirpe B6CBAF1, el valor más alto de espermatozoides motiles tras la descongelación correspondió a RL, -20°C/min, 31,69% siendo el resto de valores significativamente inferiores a este. El descenso en la motilidad progresiva de espermatozoides de la estirpe C57Bl/6 fue significativamente mayor que en el caso de la estirpe B6CBAF1. Se obtuvieron valores de entre el 6,11% y el 8,03% (HG, -20°C/min y HG, -40°C/min, respectivamente).

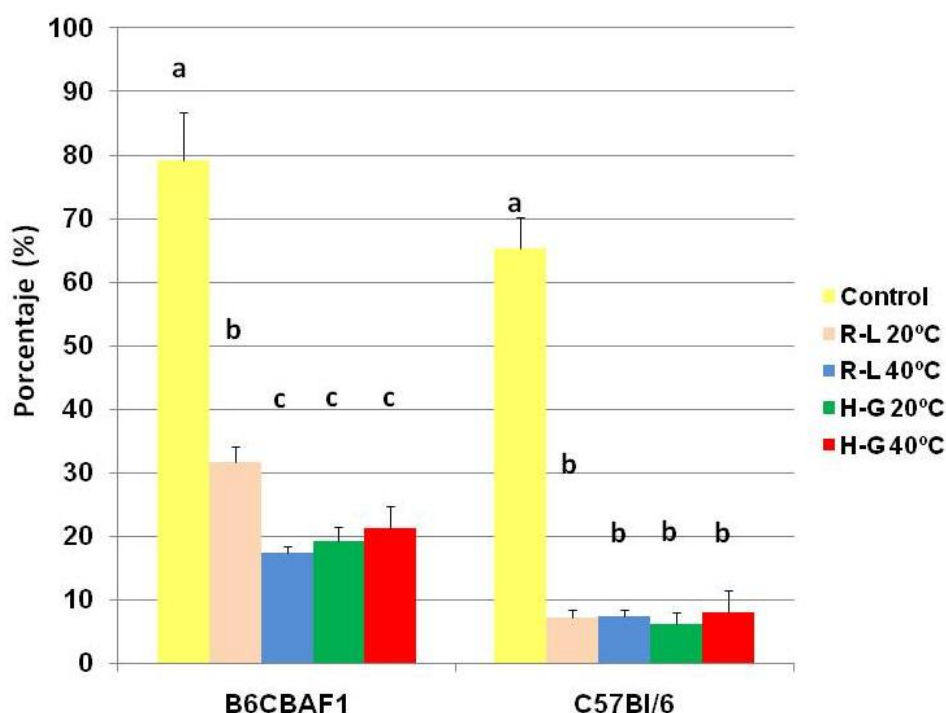


Fig. 17 Porcentaje de espermatozoides mótiles (móviles progresivos) tras análisis mediante Computer Sperm System Analysis (CASA). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Análisis ANOVA comparando tratamientos dentro de una estirpe.

En cuanto a la integridad acrosomal, los valores de partida para espermatozoides frescos, fueron muy altos en las 2 estirpes estudiadas (99% y 93,7% B6CBAF1 y C57Bl/6, respectivamente). Tras el proceso de congelación-descongelación, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma integro se estableció entre el 59,5-61,80% para la estirpe B6CBAF1 y el 45,8-53,40% para la estirpe C57Bl/6, sin que existieran diferencias significativas entre los tratamientos analizados dentro de la misma estirpe.

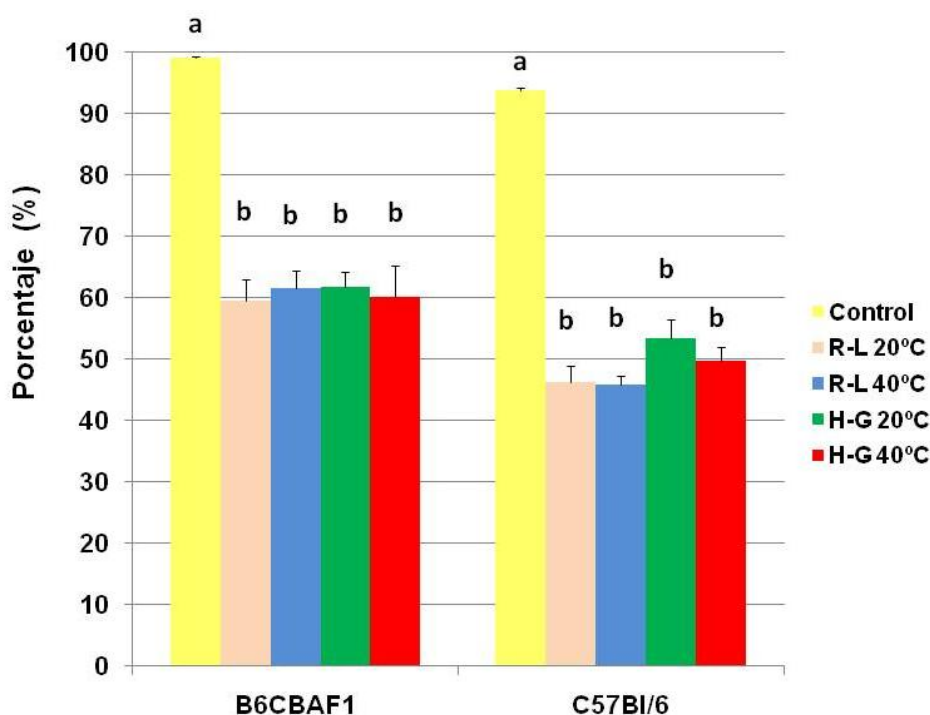


Fig. 18 Porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto tras realizarse valoración al microscopio de contraste de fases y fijación con glutaraldehído al 2,5%. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Análisis ANOVA comparando tratamientos dentro de una estirpe.

FRAGMENTACION DEL ADN: SCGE Y TUNEL.

Es conocido que durante determinados procesos fisiológicos o patológicos el espermatozoide puede sufrir alteraciones en el ADN que porta (Agarwal et al., 2003; Ozmen et al., 2007). Si bien es cierto que existen especies que son más resistentes (Flores et al., 2009; Verza et al., 2009) el proceso de congelación, de forma general, suele ocasionar roturas en las hebras del ADN (Yildiz et al., 2007) así como otras modificaciones debidas al proceso de descongelación (Critser and Mobraaten, 2000; Gandini et al., 2006; Martins et al., 2007b; Tao et al., 1995).

Evaluamos la integridad del ADN portado por espermatozoides de ratón antes y después de la congelación con el fin de correlacionar este parámetro con la baja fertilidad post-descongelación. En primer lugar utilizamos la técnica de TUNEL. Así al evaluar la población que presenta roturas en su ADN, se comprobó que un 5,77% de la población de espermatozoides epididimarios de la estirpe B6CBAF1 presentaba roturas en su ADN, incrementándose significativamente tras la descongelación solamente en el tratamiento HG a -20°C/min. Fue, sin embargo, en la estirpe C57Bl/6, donde se comprobó un incremento mayor en la fragmentación del ADN tras la descongelación. Tomando los valores basales de fragmentación, 5,65%, éstos se vieron incrementados hasta el 11,1%, en el tratamiento RL a -40°C/min, no existiendo diferencias significativas entre los tratamientos analizados pero si con el control (a excepción del tratamiento RL a -20°C/min ($p > 0,05$)). Estos datos podrían estar sugiriendo una mayor susceptibilidad por parte de la estirpe C57Bl/6 al proceso de congelación

descongelación, si bien es cierto que con los valores de fragmentación obtenidos no se puede concluir que estas roturas sean vitales para la fertilidad del espermatozoide.

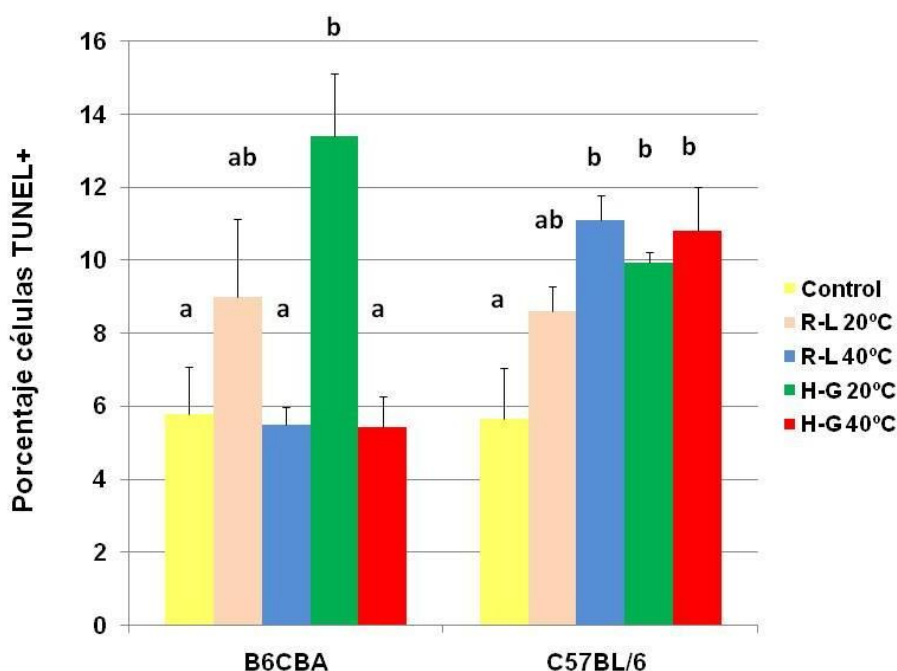


Fig. 19 Porcentaje de espermatozoides TUNEL positivos tras realizarse análisis de la fragmentación del ADN espermático utilizando el kit Live/Death (ROCHE). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Análisis ANOVA comparando tratamientos dentro de una estirpe.

Adicionalmente se analizó únicamente la presencia de roturas en ambas hebras de ADN, una situación grave desde el punto de vista fisiológico. Para ello se eligió como técnica la de COMET o SCGE. En esta técnica se puede evaluar tanto la intensidad de la rotura (como media de toda la población analizada) así como un análisis poblacional de los espermatozoides portadores de rotura. Así, la estirpe B6CBAF1 presentó un valor de fragmentación en los espermatozoides epididimarios, en términos de longitud de cola, de 16,78 px muy similar al obtenido en C57BL/6, 18,71 px. El proceso de congelación-descongelación incrementó el valor hasta 32,73 px (RL, -20°C/min) en B6CBAF1. Solo resultó que el tratamiento RL, -40°C/min fue el procedimiento que no vio afectado su nivel de fragmentación. Por otra parte, en la estirpe C57BL/6, todos los tratamientos mostraron un incremento en sus niveles de fragmentación, no existiendo diferencias entre ellos pero si con el control.

Desde el punto de vista poblacional, en la estirpe B6CBAF1, se observó que en el rango de 0-25 pixels, existieron diferencias en cuanto al porcentaje de espermatozoides que alcanzan esos valores. Mientras que el espermatozoide fresco presenta el 90% de espermatozoides en ese rango, solo el tratamiento RL a -40°C/min alcanzó un 70% de espermatozoides en citado rango. El resto de tratamientos alcanzó valores del 50% o inferiores. Este dato indica que sólo el espermatozoide de estirpe B6CBAF1 congelado por el método RL a -40°C/min, presentaba una buena integridad de ADN. Por otra parte, la población de espermatozoides que

presentaban una longitud de cola entre 25-50 pixels, se vio incrementada en todos los tratamientos analizados, excepto en RL a $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$, alcanzando valores del 40%.

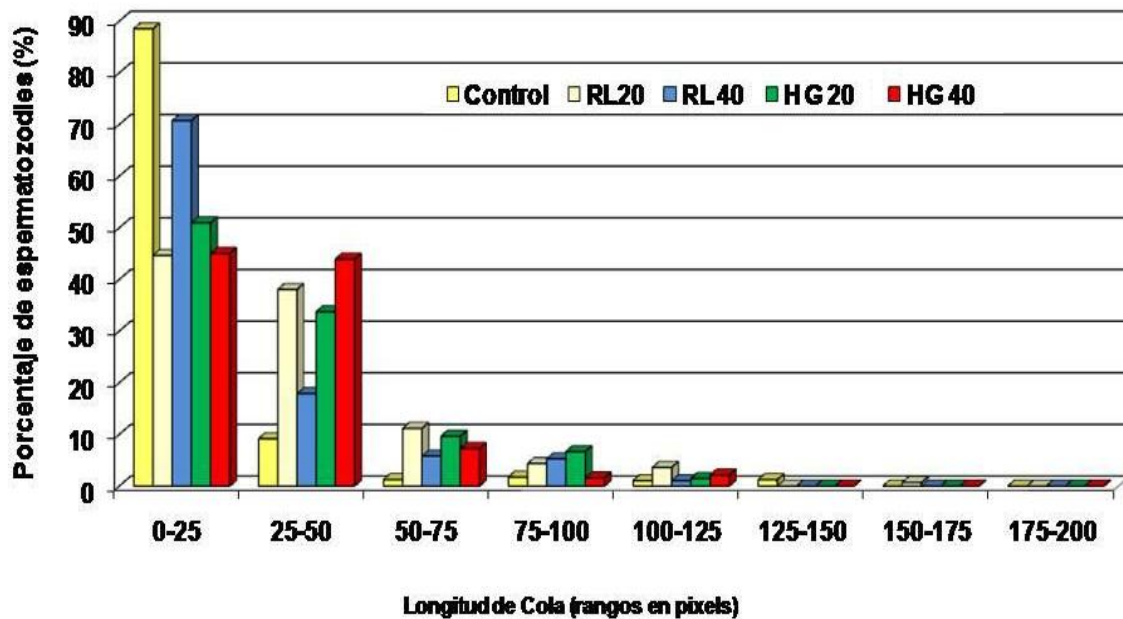


Fig. 20 Representación de histograma de frecuencias de poblaciones de espermatozoides de la estirpe B6CBAF1 con valores de longitud de cola comprendidos en los distintos rangos analizados mediante la técnica de SCGE (COMET).

En el caso de la estirpe C57Bl/6, todas los tratamientos mostraron unos niveles poblacionales inferiores al control, aunque las diferencias no eran significativas. Por otra parte, los tratamientos RL a $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y HG a $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$, mostraron un mayor número de espermatozoides dentro de la población de entre 25-50 pixeles, siendo significativamente diferentes respecto del control.

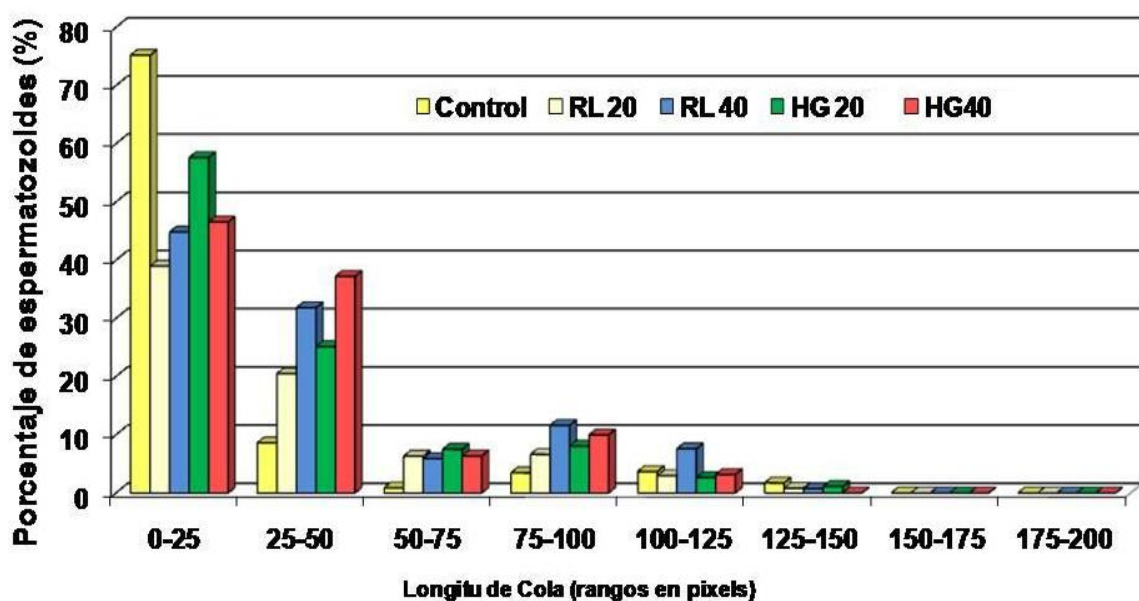


Fig. 21 Representación de histograma de frecuencias de poblaciones de espermatozoides de la estirpe C57Bl/6 con valores de longitud de cola comprendidos en los distintos rangos analizados mediante la técnica de SCGE (COMET)

FECUNDACIÓN IN VITRO

Los resultados de fecundación *in vitro* son los que de forma más evidente muestran la capacidad fecundante del espermatozoides congelado.

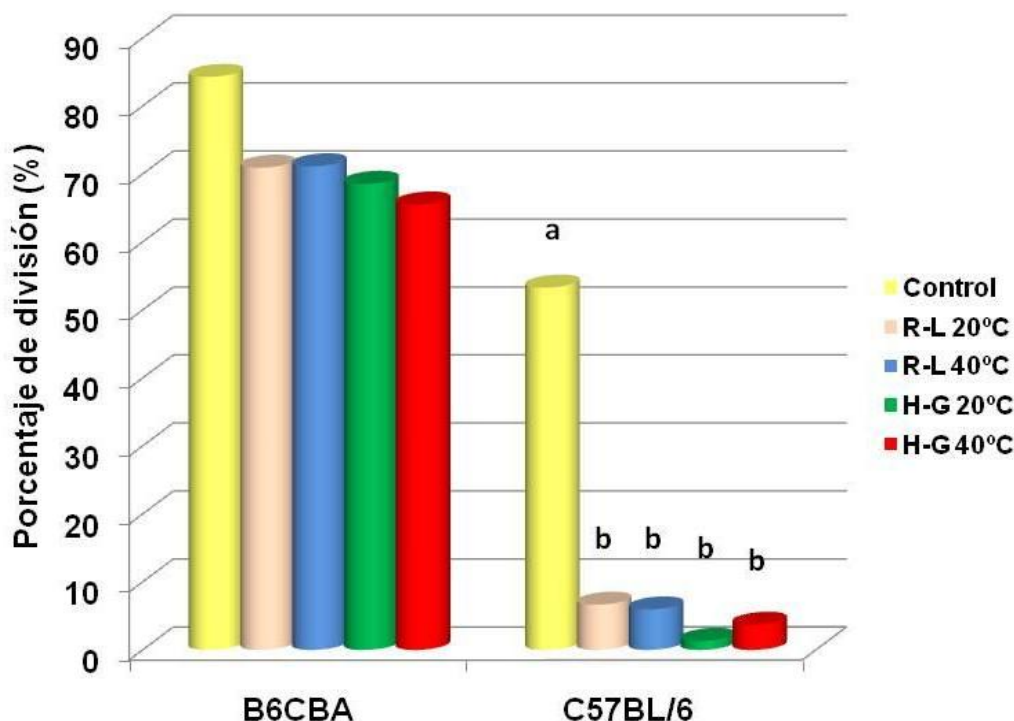


Fig. 22 Porcentaje de fecundación tras la realización de FIV con espermatozoides congelados y frescos. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$)

Como se observa en el caso de la estirpe B6CBAF1 (Fig. 20), ninguno de los protocolos de congelación analizados presentó diferencias en capacidad de fecundación con el control. Por su parte el espermatozoides fresco de C57BL/6 mostró un descenso en su capacidad fecundante hasta el 50% (aproximadamente), mientras que los tratamientos de congelación hicieron que esta capacidad disminuyera hasta el 7% o incluso menores. Con estos resultados se hace muy complicado la recuperación de líneas murinas con fondo C57BL/6 basándose en espermatozoides congelados, siendo necesario recurrir a técnicas alternativas que aseguren una mayor eficiencia en la fecundación.

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL OVIDUCTAL

En un primer estudio preliminar se estudió la dosis óptima para llevar a cabo la inseminación. Puesto que las dosis congeladas presentan varios hándicaps como son la concentración y motilidad de las muestras, se quiso evaluar la influencia de estos parámetros sobre la fertilidad.

Se tomaron tres diferentes dosis de inseminación, 200, 2000 y 20000 espermatozoides en un volumen de 2 μ l, de acuerdo a lo descrito en la literatura (Sato et al., 2002; Sato et al., 2004).

Se observó, al igual que sucedía en la fecundación *in vitro*, la alta capacidad fecundante del esperma B6CBAF1 con quien se consiguieron eficiencias del 50% con una dosis de 20000 espermatozoides en hembras de fondo B6CBAF1. Si el fondo genético sobre el que se inseminaba se cambiaba a C57Bl/6, los porcentajes fueron similares, volviendo a resultar más eficiente la dosis de 20000 espermatozoides.

Si se analiza el comportamiento de esperma fresco de C57Bl/6, el porcentaje descendió hasta valores comprendidos entre el 30-40%, dependiendo de las dosis. Cuando el fondo utilizado es el híbrido B6CBAF1, las dosis 20000 espermatozoides y 200000 espermatozoides mostraron los valores más altos de porcentaje de fecundación, mientras que con hembras de fondo C57Bl/6, sólo la dosis de 2000 espermatozoides resultó efectiva (42%).

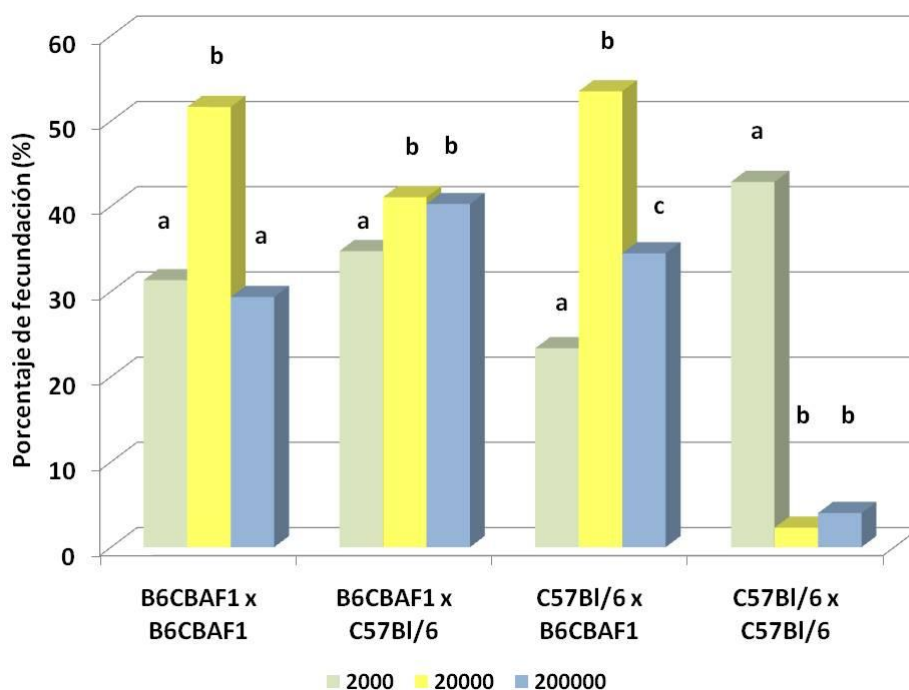


Fig. 23 Porcentaje de fecundación tras la realización de inseminación artificial oviductal con diferentes dosis de esperma fresco de las estirpes B6CBAF1 y C57Bl/6 y ovocitos de las mismas estirpes en combinación factorial. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$)

De estos resultados se infiere cómo el ovocito influye también sobre la capacidad fecundante del esperma. La dosis de 20000 espermatozoides con una motilidad entorno al 85% o superior, fecundarían entre 13-15 h post hCG con una eficiencia cercana al 50%.

Tras comprobar que la combinación espermatozoides C57Bl/6 con ovocitos de la misma estirpe era la peor opción para conseguir recuperar una línea transgénica mediante inseminación artificial, se decidió realizar las inseminaciones en hembras de fondo B6CBAF1. Esto implicaba que el esperma C57Bl/6 congelado podría tener cierta ventaja al fecundar un ovocito híbrido, sin embargo plantea un problema de fondo genético pues los individuos

obtenidos mediante esta vía serían híbridos, lo que implica que la recuperación del fondo genético original obliga a volver crear una línea congénica

A pesar de este claro limitante, se procedió a realizar las inseminaciones con la dosis de 20.000 espermatozoides. El esperma control (B6CBAF1) presentó una tasa de fecundación mayor del 40%, claramente inferior a la fertilidad en monta natural para esta estirpe (>90%). Sin embargo con esperma B6CBAF1 congelado y ovocitos del mismo fondo, se consiguieron tasas del mismo orden que el control (40%). Al igual que ocurre cuando se realiza FIV, no existen diferencias significativas entre el esperma B6CBAF1 fresco y congelado.

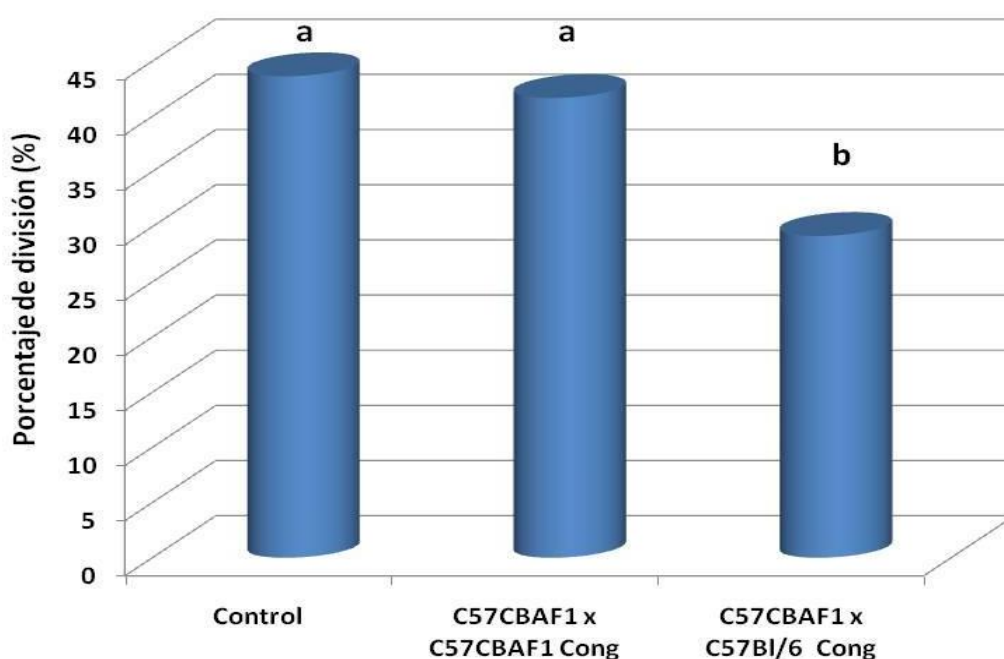


Fig. 24 Porcentaje de fecundación obtenido tras inseminar hembras B6CBAF1 con espermatozoides B6CBAF1 frescos (Control), B6CBAF1 Congelados (control congelado) y C57BI/6 (problema). Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$)

Con esperma congelado C57BI/6 se obtuvo aproximadamente un 25% de fecundación. Este dato superó la eficiencia del 7% que con esperma congelado de la cepa C57BI/6 se consiguió mediante FIV. A pesar de esta diferencia, la eficiencia de la técnica de inseminación puede que no permita una utilización rutinaria como la que los servicios de animalario requieren para la recuperación de líneas transgénicas o mutantes.

DISCUSIÓN

Actualmente existe una creciente demanda de las técnicas de conservación de esperma, no sólo en laboratorios y animalarios de una determinada institución sino también a nivel de los repositorios mundiales. Conservar esperma es notablemente más económico y requiere un número sensiblemente menor de animales (Ostermeier et al., 2008). La frustrante falta de

repetitividad de la técnica originalmente descrita por Tada y colaboradores (Tada et al., 1990), las especiales características de la célula espermática murina y la especial criosensibilidad del fondo genético C57Bl/6, fondo de elección para el mantenimiento de las principales líneas genéticamente modificadas, es el factor limitante más destacado para permitir el establecimiento de este protocolo de forma generalizada.

Nuestro objetivo en este trabajo ha sido tratar de definir condiciones que permitan mejorar estos resultados. Además de estudiar la incidencia de la fragmentación espermática como posible causa del fracaso de la congelación, también realizamos un estudio comparativo de dos crioprotectores y dos rampas de congelación con objeto de mejorar la supervivencia espermática. Ante los resultados obtenidos, estudiamos un sistema que nos permitiera maximizar la capacidad fecundante de espermatozoides con viabilidad post-descongelación comprometida basándonos en nuestros estudios previos que habían puesto de manifiesto una capacidad de selección del tracto femenino hacia los espermatozoides de mayor motilidad y mayor integridad de ADN.

Los resultados de integridad de membrana demostraron que durante la congelación de la estirpe B6CBAF1 existe un descenso en la población de espermatozoides viables que ocurre en un porcentaje similar al encontrado en la estirpe C57Bl/6. Estos resultados muestran como independientemente del protocolo de congelación, el espermatozoide de ratón presenta gran susceptibilidad al daño en su membrana debido a la formación de hielo intracelular (Koshimoto et al., 2000; Mazur and Koshimoto, 2002) y cambios de presión osmótica (Songsasen and Leibo, 1997a; Songsasen and Leibo, 1997b) que tienen lugar durante la congelación. Análogamente, el descenso en la motilidad de los espermatozoides tras los procedimientos de congelación-descongelación es significativa en ambos fondos genéticos, pero mucho más patente en la estirpe C57Bl/6. La evolución pareja de motilidad e integridad de membrana que hemos encontrado coincide con otros resultados publicados en los que se ha descrito la relación entre ambos parámetros tras diferentes procesos (Hourcade et al.; Huang et al., 2005; Ramos and Wetzels, 2001)

En nuestro estudio, la integridad del acrosoma se mantuvo independientemente del crioprotector, rampa de congelación o fondo genético estudiado. Esta alta integridad permitiría pronosticar una buena capacidad fecundante, sin embargo en esta especie claramente no es un factor determinante. La integridad del acrosoma es por tanto una prueba de contrastación de interés limitado, a diferencia de otras especies donde es un claro indicador de fertilidad (Aitken et al., 2006; Bussalleu et al., 2005; Jeyendran et al., 1985)

En base a estos resultados de todas las combinaciones ensayadas (crioprotector x descenso térmico), sólo el crioprotector a base de rafinosa y leche descremada (RL), -20°C/min mostró una mayor capacidad protectora permitiendo mayores valores en cuanto a integridad de

membrana y motilidad a la descongelación. Ya se había descrito anteriormente el efecto beneficioso de descensos de temperatura lentos durante los procesos de congelación (Critser and Mobraaten, 2000; Devireddy et al., 1999; Koshimoto and Mazur, 2002). Parece que la utilización de mezclas de diferentes crioprotectores incrementa la proporción de espermatozoides con alta integridad de membrana plasmática y alta motilidad (Storey et al., 1998; Tada et al., 1990; Yokoyama et al., 1990) sin embargo no todas las combinaciones son igual de eficientes. En nuestro caso la utilización de glicerol, uno de los crioprotectores penetrantes universalmente utilizados no es capaz, en combinación con las proteínas de la yema de huevo, de lograr el mismo efecto que la utilización de una combinación de crioprotector no penetrante, como es la rafinosa, con las proteínas de la leche descremada

Históricamente existen discrepancias sobre el crioprotector de elección. La difusión de los crioprotectores penetrantes (glicerol, propanodiol, etc.) depende de sus coeficientes de difusión a través de la membrana plasmática. Esta difusión, en algunos casos puede ser lenta pues ha de darse un conjunto de modificaciones en la membrana del espermatozoide para que éste difunda a su través (Gao and Critser, 2000) aumentando el efecto toxico sobre el espermatozoide. Sin embargo la utilización de crioprotectores no penetrantes, como ciertos tipos de azúcares (rafinosa, fructosa...) han demostrado ser altamente efectivos en algunos tipos de estirpes (Storey et al., 1998). La utilización de unos u otros crioprotectores ha de ser un compromiso, de forma que las funciones básicas del espermatozoide se mantengan, pues el último objeto de la conservación mediante estas vías es la realización de fecundación *in vitro* para la generación de nuevos individuos que permitan la reposición de la línea.

La integridad del ADN espermático es esencial para una correcta transmisión de la información genética paterna. Una correcta condensación y estabilización de la cromatina espermática en el núcleo seguida de la descondensación después de la penetración e inyección dentro del citoplasma del ovocito son requisitos para la fecundación (Flaherty et al., 1995). Los efectos de la congelación sobre la integridad del núcleo espermático no están aún bien caracterizados. Se sabe que los procesos de congelación y descongelación pueden hacer que la condensación de la cromatina sea defectuosa en humanos (Donnelly et al., 2001; Hammadeh et al., 2001; Royere et al., 1988; Royere et al., 1991), cerdo (Fraser and Strzezek, 2004), caballo (Linfor and Meyers, 2002) y morueco (Peris et al., 2004). En nuestro estudio, comprobamos mediante la técnica de TUNEL que existe una mayor susceptibilidad al daño, de forma general en la estirpe C57Bl/6, pues todas las combinaciones de crioprotectores mostraron unos porcentajes de espermatozoides TUNEL+ superiores a los valores del control. En el caso de la estirpe híbrida, sólo el tratamiento HG, -20°C/min supuso un incremento en la fragmentación. Este resultado demuestra la diferente susceptibilidad y resistencia a los procesos de congelación y descongelación de las diferentes estirpes de ratón y su efecto sobre el ADN, aunque los niveles de daño encontrados no justifican la drástica caída de la fertilidad en las muestras descongeladas. Tampoco se puede atribuir a este factor la mayor

susceptibilidad a la congelación en la estirpe C57Bl/6. Nuevamente nos encontramos con otro parámetro de contrastación espermática que, como la integridad del acrosoma, tiene un papel secundario en cuanto a la determinación de la fertilidad tras la descongelación. Si es interesante de todas formas constatar que el daño en el ADN espermático es reducido, con lo que permite la utilización de estas dosis para técnicas reproductivas, que como la ICSI escapan a los mecanismos naturales de selección (Larsson and Rodriguez-Martinez, 2000; Tesarik et al., 2004).

En este trabajo se decidió realizar una técnica adicional para el análisis de la fragmentación del ADN espermático además del TUNEL. El motivo de esta estrategia fue tratar de obtener una visión más amplia de las posibles implicaciones de la fragmentación espermática en la fertilidad ya que cada técnica evalúa diferentes zonas de la cromatina espermática. Mientras que la técnica de TUNEL, debido al protocolo de descondensación de la cromatina utilizado durante el procedimiento, sólo permite un análisis de la fragmentación de la zona situada entre los lazos de ADN que conforman el ADN espermático (Ward, 1994), la técnica de SCGE (COMET) al utilizar un protocolo de descondensación más prolongado y potente, favorece la descondensación de las protaminas que conforman los lazos (Ward), revelando posibles fracturas tanto enhebra simple como doble del ADN (al igual que la técnica de TUNEL) en esas zonas. Esta diferencia en el tipo de daño detectado justifica las diferencias en los resultados obtenidos por una y otra técnica. En ambas estirpes analizadas, la congelación genera fragmentación del ADN espermático y sólo el grupo de RL, a -40°C/min muestra niveles poblacionales de espermatozoides menos fragmentados que el resto de protocolos descritos. La técnica de COMET detecta una susceptibilidad alta al daño en todos los tratamientos en la estirpe C57Bl/6, sin embargo los niveles de fragmentación son comparables en ambas estirpes aunque una de ellas fecunda y la otra no, por lo que no es posible en base a estos resultados atribuir la incapacidad de fecundar de la estirpe C57Bl/6 a la fragmentación del ADN.

Nuestros resultados de fecundación *in vitro* muy similares a los descritos por otros autores, muestran la necesidad de implementar nuevas técnicas que permitan un aumento de la eficiencia en la fecundación con espermatozoides congelados de la estirpe C57Bl/6. Estudios previos han demostrado que independientemente de los crioprotectores utilizados, el problema que se plantea a la hora de utilizar esperma congelado de C57Bl/6 es su incapacidad para fecundar debido a un fallo en la capacitación. Así, Takeo, Liu y Taguma en trabajos por separado (Liu et al., 2009; Taguma et al., 2009; Takeo et al., 2008), demostraron que incorporando metil- β -ciclodextrina, una molécula con una zona hidrófoba en forma de canal capaz de secuestrar colesterol de la membrana del espermatozoide, desencadena la capacitación en esta estirpe y con ello se incrementaban las tasas de fecundación obtenidas hasta la fecha. Desde aquel momento, otras variaciones se han dado como es la introducción de esta molécula junto con otras de características similares tanto en los medios de

congelación (Liu et al., 2009; Ostermeier et al., 2008) como en los de descongelación (Taguma et al., 2009; Takeo et al., 2008). En este último caso se abre una puerta para recuperar aquellas muestras que ya se han congelado y se encuentran en los repositorios de líneas transgénicas y mutantes, aunque los resultados reportados son muy variables. La criosensibilidad de la estirpe no sólo se manifiesta por la imposibilidad de capacitarse adecuadamente, sino por una alteración de la motilidad en general. Mientras las diferencias en porcentajes de vivos a la descongelación entre ambas estirpes, son mucho menos marcadas que la drástica caída en motilidad y capacidad fecundante que tal vez requiera un estudio mucho más pormenorizado de esta función a nivel mitocondrial o metabolismo energético (Bollwein et al., 2008).

Los principales problemas con los que nos encontramos tras la descongelación son la baja concentración de espermatozoides y la escasa proporción de motiles. Para no dañar al oviducto en la manipulación, se decidió modificar una de las aproximaciones para la inseminación artificial en ratón ya descritas (Sato and Kimura, 2001; Takeshima and Toyoda, 1977). Esta variación consiste en utilizar el infundíbulo como vía de entrada de los espermatozoides al oviducto. La modificación de la técnica original motivó la necesidad de establecer la dosis mínima necesaria de espermatozoides. Nuestros resultados mostraron la necesidad de un número de espermatozoides mínimo para dar cuenta de la fecundación, fenómeno ya descrito por otros autores en fecundación *in vitro* (Smith and Yanagimachi, 1989; Stewart-Savage and Bavister, 1988; Tsunoda and Chang, 1975) y en otras técnicas de fecundación artificial (Duselis and Vrana, 2007; Sato et al., 2002; Sato et al., 2004). Nuestros resultados también sugieren que un aumento en el número de espermatozoides puede ser contraproducente durante la fecundación (Suh et al., 2006). La utilización de esta vía tiene como inconveniente el que se evita la barrera más importante de selección, la unión útero tubal (Hourcade et al.) y sin embargo tiene el problema de que aunque técnicamente es posible, precisa un número elevado de espermatozoides móviles que pudiesen sobrepasar la unión útero tubal (Smith et al., 1988; Smith and Yanagimachi, 1989; Stewart-Savage and Bavister, 1988; Sumransap et al., 2007; Tummaruk et al., 2007). Esta cantidad es difícil de obtener con las técnicas de congelación actuales.

Nuestros experimentos de inseminación han puesto además de claro manifiesto que en éxito no está sólo vinculado al fondo genético del espermatozoide, también el ovocito juega un papel crucial que limita el procedimiento, haciendo que éste, finalmente, sea viable o inviable. Nuestros estudios con esperma fresco de ambos fondos genéticos, puso de manifiesto que la utilización de ovocitos C57Bl/6 disminuía significativamente las tasas de fecundación. Esta situación restringe la utilización práctica de este procedimiento, ya que aunque aumenta los resultados de fertilidad respecto a la fecundación *in vitro*, altera el fondo genético de la línea recuperada, que sólo se puede recuperar tras un proceso laborioso de retrocruzamiento para la obtención de una línea congénica. Utilizando ovocitos de hembras B6CBAF1 los porcentajes

obtenidos con espermatozoides congelados de la estirpe B6CBAF1, mostraron un comportamiento similar al control fresco. La utilización de espermatozoides congelados de la estirpe C57Bl/6 mostró un porcentaje entorno al 20% que dista de ser una eficiencia adecuada para un manejo rutinario en el laboratorio, pero mejora los porcentajes obtenidos mediante técnicas como la fecundación *in vitro* (>5%) aunque no llega a los obtenidos con ICSI (>90%).

De nuestros resultados se desprende que los fenómenos de selección planteados inicialmente (Hourcade et al.) requieren de un entorno muy distinto al lugar en donde se han realizado las inseminaciones en este trabajo. El oviducto es una zona en donde el espermatozoide entra sin capacitar y es donde se produce este fenómeno. En esta ocasión se ha forzado una situación en donde conviven ambas poblaciones. La posibilidad de que el oviducto elimine aquellos espermatozoides que no van a fecundar o que son portadores de algún tipo de alteración estructural (p. ej. daño en el ADN) parece que no es un fenómeno que se esté dando en estas circunstancias.

La utilización de la fecundación *in vivo* mediante inseminación intra-ovárica, queda pues como única alternativa en caso de no disponer de la tecnología de ICSI, ya que sí permite mejorar los resultados de fecundación, aunque no lo suficiente como para recomendarla como técnica rutinaria y siempre teniendo en cuenta que es necesaria una transferencia de los embriones a una receptora pseudogestante para poder obtener individuos vivos.

CAPÍTULO III

**TRANSPORTE DE EMBRIONES EN CONDICIONES DE NO CONGELACIÓN
COMO ALTERNATIVA VÁLIDA PARA EL INTERCAMBIO DE LÍNEAS
MURINAS ENTRE LABORATORIOS.**

RESUMEN

El aumento exponencial en la generación de animales transgénicos en los últimos años ha originado también un incremento en el intercambio de estas estirpes mutantes entre instituciones lo que supone un riesgo sanitario si se realiza con animales vivos o una técnica relativamente más compleja si se utilizan gametos o embriones congelados. En este capítulo se han planteado un conjunto de procedimientos que son una alternativa viable para el transporte de embriones sin detrimento de su capacidad de desarrollo *in vivo* evitando recurrir a la criopreservación. Utilizando embriones en estadio de mórula, hemos analizado como el medio de cultivo, la temperatura y el tiempo de transporte, afectan al transporte de embriones. Teniendo en cuenta la posibilidad de inducir diapausa en el embrión de ratón mediante alteraciones de la temperatura, se contempló la posibilidad de utilizar temperaturas en torno a 4°C; así mismo se evaluaron 15° y 37°C como temperaturas alternativas, en todos los casos sin utilizar atmosfera controlada (CO₂ y humedad). Puesto que la recuperación de embriones a partir del lavado de oviductos requiere una formación específica en técnicas reproductivas que no es frecuente en el personal de los animalarios y con objeto de simplificar el procedimiento, se evaluó si era posible transportar mórulas procedentes de cultivo *in vitro*; incluso valorar si estas mismas mórulas podrían ser enviadas aún localizadas en los propios oviductos, a laboratorios en los que sí existiese un personal cualificados que pudiese realizar la técnica de lavado. Mientras que el transporte de mórulas procedentes del cultivo *in vitro* y aquellas que fueron transportadas en el propio oviducto se analizaron durante 24 h, el resto de procedimientos se realizaron durante dos periodos de tiempo: 24 y 48 h. Este tiempo se estableció como periodo en el que es posible realizar un envío prácticamente a cualquier parte del mundo. El efecto de las distintas condiciones de transporte se valoró en base al desarrollo *in vitro*, al número de células y fundamentalmente al desarrollo *in vivo* tras transferencia a hembras receptoras.

Adicionalmente, y con objeto de abundar en el conocimiento de los procesos moleculares que subyacen en el desarrollo del embrión, se analizó el nivel de transcritos correspondientes a genes implicados en importantes funciones para el embrión (apoptosis, metabolismo, comunicación celular y pluripotencia). Los resultados demostraron que el transporte de embriones en estadio de mórula desarrollados *in vivo* es más eficiente que el de aquellos que habían sido cultivados *in vitro* hasta el estadio de mórula y que la permanencia en los oviductos también influye negativamente. Los resultados en este trabajo presentados muestran que es posible realizar transporte de mórulas recién obtenidas 24 h en cualquiera de las condiciones ensayadas siempre y cuando éstas no se mantengan dentro del oviducto, sin detrimento de la capacidad de implantación embrionaria, obteniendo supervivencias que oscilaron entre el 60 y el 90%, Estos valores de viabilidad permiten obtener un número de animales vivos suficiente para el re-establecimiento de una nueva línea en cualquier animalario. Tras un periodo de 48 h a 15°C, existió un descenso en la viabilidad embrionaria (<10%), lo que hace más aconsejable el uso de las bajas temperaturas (4°C) para tiempos prolongados de

transporte. Desde el punto de vista molecular, se constató una alteración en los niveles de expresión de los transcritos correspondientes a retrotransposones (IAP y MuERV-L).

INTRODUCCIÓN

Dentro de las diferentes situaciones que se deben resolver en un animalario de forma constante destaca el intercambio de animales resultante del aumento en el número de colaboraciones científicas que se ha venido dando en los últimos años. Las formas de intercambio no siempre son sencillas debido a restricciones en el transporte de animales vivos y la necesidad de garantizar el estado sanitario de la colonia receptora.

El transporte de embriones congelados cumple cualquiera de los requisitos existentes en cuanto a Salud y Bienestar Animal, siendo inexistente el riesgo de liberar OMGs al medio. Sin embargo, este tipo de transporte requiere de la presencia de un experto en congelación de embriones así como la disposición de un sistema de contenedores de acuerdo a la normativa IATA (International Air Transport Association) por la naturaleza de mercancía peligrosa inherente al nitrógeno líquido. El intercambio de especímenes entre animalarios actualmente se puede dar en menos de 24 h por transporte terrestre dentro del territorio nacional y podría realizarse con embriones frescos. Las empresas de mensajería son capaces de hacer llegar en menos de 48 h cualquier envío a cualquier parte del mundo, de ahí el interés de definir un protocolo de transporte para embriones frescos que facilite el intercambio de líneas transgénicas entre animalarios sin la necesidad de usar contenedores especiales o la disponibilidad de técnicas de criopreservación haciendo accesible el intercambio a más instalación y abaratando los costes.

La preservación a largo plazo de embriones se realiza, sumergiendo el embrión en los crioprotectores adecuados y almacenándolo en nitrógeno líquido. Para periodos más cortos se han evaluado la utilización de temperaturas entre 0° y 4°C para mantener embriones en un estado de inhibición metabólica inducida. Este es un protocolo muy sencillo, barato y más conveniente que la congelación de embriones en determinadas circunstancias. Históricamente se han realizado diferentes estudios para almacenar embriones a temperaturas comprendidas entre 0° y 7°C en el caso de conejos (Chang, 1948), vacas (Bondurant et al., 1982; Lindner et al., 1983), oveja (Harper and Rowson, 1963) y ratón (Herr and Wright, 1988; Kasai, 1986; Kasai et al., 1983; Nakamura and Tsunoda, 1992; Sherman and Lin, 1959). Sin embargo la tasa de éxito dependía de la especie, estadio preimplantacional del embrión y metodología utilizada en el laboratorio. Generalmente la viabilidad del embrión decrece muy rápidamente con el tiempo de almacenamiento en condiciones de baja temperatura (0°-10°C), aunque la razón para esta circunstancia aún no ha sido aclarada. Otoi en 1999 (Otoi et al., 1999) describió una relación entre el desarrollo de los embriones de vaca a 4°C y el aumento de células necróticas; el mecanismo que subyace bajo el choque térmico de los embriones cuando son sometidos a bajas temperaturas (por debajo de 0°C) está siendo progresivamente clarificado, sin embargo, los efectos del enfriamiento por encima de 0°C, a nivel molecular, en embriones preimplantacionales permanecen aún sin aclarar.

Actualmente se utilizan diferentes condiciones para el transporte de embriones frescos y gametos. Se sabe, por ejemplo, que los ovocitos de bovino y de porcino pueden ser madurados durante la noche y transportados desde el laboratorio donde se recolectan y el laboratorio donde se van a fecundar (Davis, 1985; Preis et al., 2004). Los espermatozoides frescos de diferentes especies como el caballo (Berghuis, 1987), cerdo (Gaczarzewicz et al.) o cabra (Hollinshead et al., 2004) han sido transportados a bajas temperaturas (15°C y 5°C). También se ha determinado que el cultivo *in vitro* de embriones no compromete su viabilidad si se hace en medios optimizados y periodos de 24-48h y deja la puerta abierta a la exploración de nuevas condiciones así como la posibilidad de analizar nuevos parámetros que puedan ser interesantes en la comprensión del comportamiento del embrión fuera de las condiciones fisiológicas *in vivo* o en situación de cultivo *in vitro*.

En este trabajo se ha explorado la posibilidad de transportar embriones de ratón en estadio de mórula mediante diferentes abordajes experimentales. Desde el transporte del propio embrión desarrollado *in vivo* o previo cultivo *in vitro* hasta el transporte de embriones contenidos en el oviducto. En todos los casos se analizó la influencia del medio de cultivo, la temperatura y el tiempo de transporte. Esta investigación brinda la oportunidad de dar un protocolo práctico que pueda aplicarse en situaciones cotidianas de funcionamiento en los animalarios

DISEÑO EXPERIMENTAL

La primera cuestión a tener en cuenta fue el estadio del desarrollo en el que transportar los embriones, con el fin de obtener la máxima eficiencia en el desarrollo post-implantacional tras el transporte. La literatura reveló que el estadio en el que el embrión corre menos riesgos (mecánicos, metabólicos, etc.) es en el estadio de mórula (Herr and Wright, 1988).

Como se expone en el esquema del diseño experimental, se quiso implementar un protocolo de transporte de embriones que permitiese a la mayoría del personal presente en los animalarios, en función de su habilidad en el manejo de embriones, realizar alguno de los procedimientos planteados. En el experimento 1 los embriones obtenidos en estadio de mórula mediante lavado del oviducto de la hembra fueron transportados en diferentes condiciones durante 24 o 48 h. Se seleccionaron 3 temperaturas 4, 15 y 37° C. Para las 3 temperaturas hay sistemas habilitados que permiten garantizar su mantenimiento sin fluctuaciones durante periodos de tiempo de 24-48 h. En el experimento 2, cigotos obtenidos de las hembras fueron cultivados hasta el estadio de mórula, para posteriormente ser transportados durante 24 h en las diferentes condiciones estipuladas. Finalmente, en el experimento 3, explorando una posible simplificación del manejo las mórulas desarrolladas *in vivo* eran transportadas directamente dentro de los oviductos, siendo éstos los sometidos a las condiciones de transporte. Todas estas medidas cubrían las posibilidades técnicas para el personal que debiese realizar un hipotético transporte de embriones entre laboratorios.

EXPERIMENTO 1 MORULAS DESARROLLADAS IN VIVO SON TRANSPORTADAS DURANTE 24 Y 48 H

Las mórulas desarrolladas *in vivo* fueron recogidas 2 días y medio después del coito. Grupos de 25-30 embriones fueron puestos en medio para ser transportados. Para ello, los embriones se colocaron en criotubos rellenos de 5 ml de medio de cultivo, por una parte KSOM equilibrado (24 h antes en atmosfera 5% CO₂ y 37°C) o KSOM tamponado con Hepes (KSOM-H). Los tubos fueron seleccionados al azar y colocados por parejas (KSOM y KSOM-H) a las distintas temperaturas, 4°, 15° y 37°C durante 24 ó 48 h. Pasado ese tiempo, los embriones fueron recolectados de los tubos y puestos en cultivo hasta el estadio de blastocisto expandido. Otro grupo de embriones fue transferido directamente a hembra pseudogestante, para evaluar la eficiencia del proceso *in vivo*, analizando número de fetos y reabsorciones en día 14 de gestación. En paralelo, un grupo de mórulas fue puesto en cultivo como grupo control. La eficiencia del proceso *in vitro* fue determinada evaluando el desarrollo de los embriones en cultivo hasta blastocisto así como el número de células de los diferentes tipos celulares que lo componen.

Tras 48 horas de transporte y 24 horas de cultivo *in vitro*, se evaluaron las implicaciones que a nivel molecular tiene el proceso de transporte, realizando el análisis de los niveles de transcripción de una batería de genes (Tabla 5) implicados en el desarrollo.

Hoy en día, los medios de transporte permiten disponer de envíos en un máximo de 48 h en cualquier punto del mundo, este fue el motivo por el que se decidió evaluar inicialmente la eficiencia del proceso de transporte de embriones a dos tiempos, 24 y 48 h.

EXPERIMENTO 2 MÓRULAS DESARROLLADAS IN VITRO SON TRANSPORTADAS DURANTE 24 H

Se estudió esta alternativa por el hecho de ser técnicamente más sencillo recolectar embriones en 1 célula a partir del rasgado del ampolla, que el lavado del oviducto para obtenerlos en fase de mórula. En este experimento los cigotos recolectados 20 h post hCG fueron puestos en cultivo durante 72 h hasta el estadio de mórula. Tras aislar los embriones en estadio de mórula, fueron sometidas a las mismas condiciones descritas para el apartado anterior durante 24 h

EXPERIMENTO 3 MORULAS DESARROLLADAS IN VIVO SON TRANSPORTADAS EN EL INTERIOR DEL OVIDUCTO DURANTE 24 H

Finalmente, como una nueva simplificación del manejo implicado mórulas desarrolladas *in vivo* fueron recogidas dentro de los oviductos, 2 días y medio después del coito. En esta ocasión, se escindió el oviducto del resto del útero, colocándose en criotubos rellenos de 5 ml de medio KSOM-Hepes. Cada tubo contenía entre 4-6 oviductos. Los tubos fueron seleccionados al azar y colocados a una temperatura de 4°C durante 24 h. Pasado ese tiempo, los oviductos fueron recuperados de los tubos y las mórulas contenidas en ellos, aisladas mediante lavado del oviducto (ver apartado de material y método: recolección de embriones). Posteriormente, estos embriones fueron puestos en cultivo hasta el estadio de blastocisto expandido. Análogamente a otros experimentos ya descritos, un grupo de embriones fue transferido directamente a hembra pseudogestante, evaluando así la eficiencia del proceso. Se analizó el número de fetos y reabsorciones en día 14 de gestación.

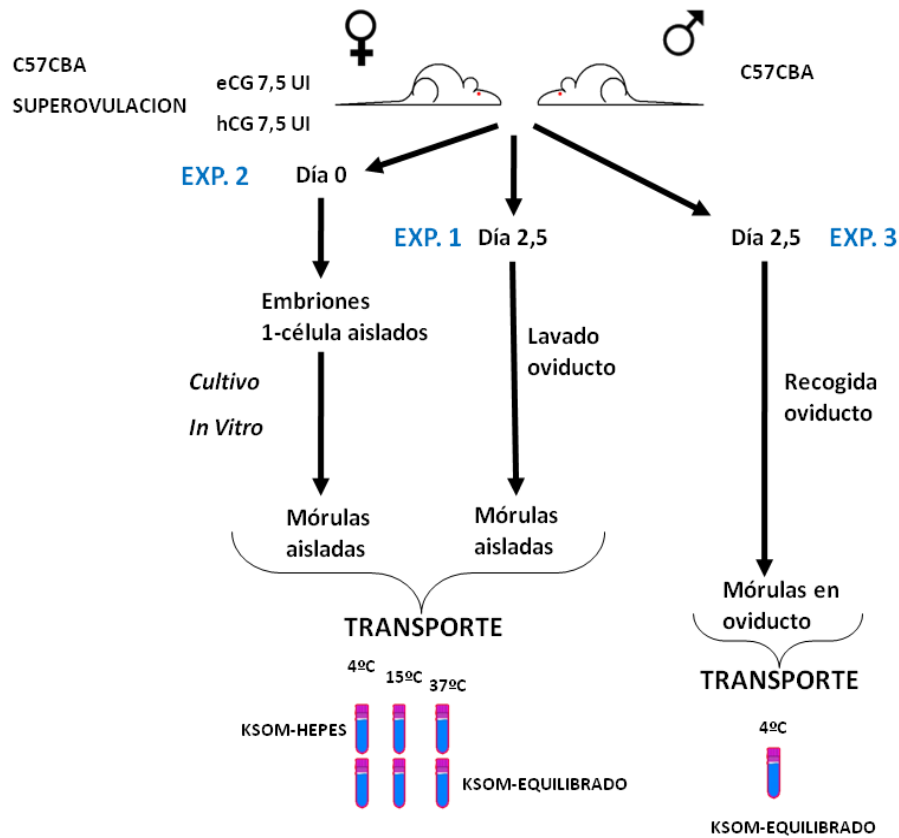


Fig. 25 Esquema del desarrollo experimental. PARTE A: Obtención de embriones y transporte simulado.

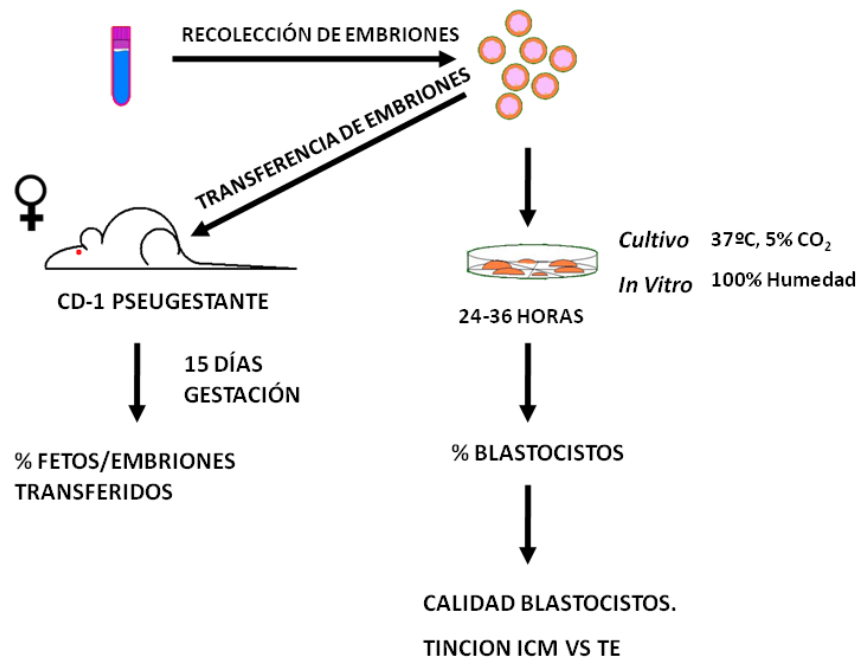


Fig. 26 Esquema del desarrollo experimental. PARTE B: Recolección de embriones tras transporte, Cultivo *in vitro* y desarrollo post-implantacional.

MATERIAL Y MÉTODOS

PRODUCCION DE EMBRIONES DE RATÓN

Se utilizaron para este experimento embriones procedentes de la superovulación de hembras B6CBAF1 cruzadas con machos del mismo fondo y que es uno de los de utilización más frecuente en la generación de transgénicos (Zúñiga et al., 2008). El protocolo de superovulación consistió en aplicar una dosis de 7,5 UI de eCG intraperitoneal (Gonadotropina Coriónica Equina, Folligon 500, Intervet International, Bexmeer, Holanda) y 48 h después una segunda inyección, también intraperitoneal, de 5 UI de hCG (Gonadotropina Coriónica Humana, Lepori Farma

RECOGIDA DE EMBRIONES

Se establecieron diferentes momentos de recolección de embriones de ratón. Para los experimentos 1 y 3, en donde se necesitaban embriones en estadio de mórula desarrollados en el tracto materno, el sacrificio de los animales se produjo 66-78 h post-hCG. Para el experimento 2, donde se requerían cigotos, el sacrificio se produjo 20 h post-hCG. El procedimiento para el aislamiento de cigotos o embriones difiere debido a las condiciones fisiológicas en las que tanto el embrión como la hembra se encuentran. Para aislar embriones en estadio de mórula, una vez sacrificada la hembra, los tractos reproductivos son expuestos tras sucesivos cortes de la cavidad abdominal y retracción de las masas de grasa corporal. En el tracto reproductivo es identificado el ovario y el oviducto dentro de la bolsa (Fig. 27). Los embriones en estadio de mórula se encuentran en el oviducto poco antes de entrar en el útero, Para su recuperación se realizó un lavado desde el infundíbulo hacia el cuerno uterino utilizando una jeringa rellena de medio de lavado M2 y acoplada a ella una aguja de 30G.

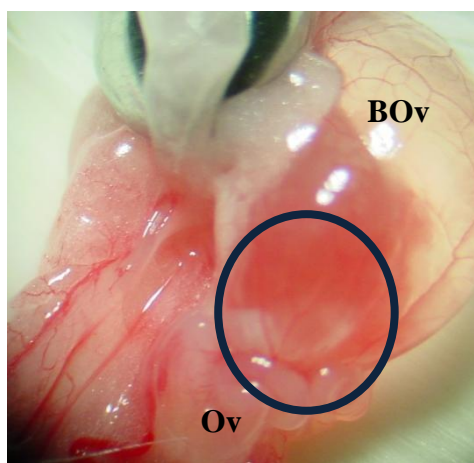


Fig. 27 Detalle del infundíbulo (círculo). Se pueden observar las diferentes circunvoluciones del oviducto que le dan un aspecto de ovillo y que se mantienen en posición próxima al ovario merced a la bolsa ovárica (BOv).

Los embriones fueron recuperados, lavados tres veces en 3 ml de M2 y distribuidos en los tubos para transporte.

En el caso de los cigotos, al estar muy próximo en el tiempo al momento de la fecundación, se encuentran rodeados de un conjunto de células denominadas células de la granulosa en la zona del ámpula (Fig. 28). Basta con rasgar la pared de la misma para que por diferencia de presión todos los complejos (COCs) salgan al medio de lavado.

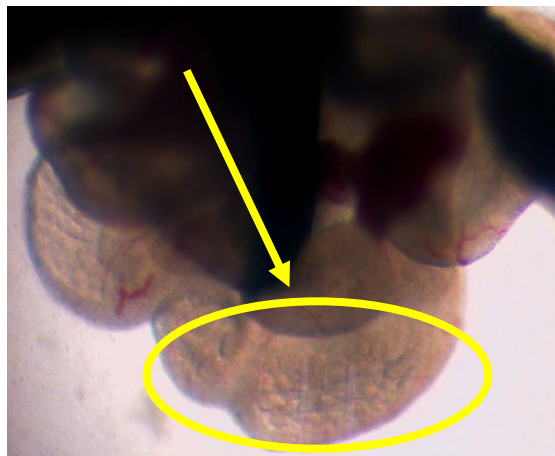


Fig. 28 Detalle del ámpula. Es en este lugar donde se encuentran los ovocitos y los cigotos en las 14-17 h después de la inyección de hCG.

Las células del cúmulo se disgregaron utilizando hialuronidasa (300 µg/ml; H3506 Sigma) y pipeteo repetido. Una vez eliminadas las células de la granulosa los cigotos fueron lavados y cultivados hasta el estadio de mórula.

CULTIVO IN VITRO.

El cultivo *in vitro* de embriones de ratón se realizó en microgotas de aproximadamente 30-40 µl de medio KSOM+aa (Erbach et al., 1994; Ho et al., 1995) bajo aceite mineral (Sigma M8410) en placas de cultivo de (35 mm, NUNC) En cada gota se dispusieron 25-35 embriones manteniéndolos en una atmosfera de 100% de humedad a 37°C a un 5% de CO₂ durante los plazos previstos por cada diseño experimental, bien desde cigoto hasta mórula, para ser transportadas posteriormente (Experimento 2) o bien, desde mórula, después de ser transportadas, hasta blastocisto, con el fin de evaluar la eficiencia del proceso de transporte a nivel funcional.

CONDICIONES DE TRANSPORTE SIMULADO

Se establecieron dos medios para transportar embriones. Por una parte KSOM equilibrado a 37°C y 5% CO₂ y KSOM tamponado con Hepes (20 mM), pudiéndose evaluar mediante esta vía el impacto de la basificación del medio y la tamponización del mismo durante un periodo largo de tiempo. La temperatura es un parámetro crítico siendo de vital importancia evaluar la eficiencia del transporte en función del mismo.

Se evaluaron 3 temperaturas 4°C, 15°C y 37°C. Para alcanzar citadas temperaturas se utilizaron cámaras frigoríficas (4°C y 15°C) o estufas de temperatura controlada (37°C). Para

las 3 temperaturas hay medios técnicos fiables que permiten garantizar su mantenimiento sin fluctuaciones durante un transporte

ANÁLISIS DEL NÚMERO DE CELULAS EN BLASTOCISTO

Para evaluar la calidad del embrión en estadio de blastocisto se puede recurrir al conteaje del número total de células que presenta, e incluso diferenciar los tipos celulares que lo componen, masa interna celular (ICM) que da lugar al feto y trofotodermo (TE) que dará lugar a la placenta. La proporción de células de uno y otro tipo respecto al total, es uno de los parámetros utilizados para evaluar la calidad de los embriones (Bagis and Odaman Mercan, 2004; Neuber et al., 2002).

Para analizar el número de células de cada uno de los tipos celulares, se utilizó una tinción diferencial que consiste en dirigir una lisis celular dirigida hacia las células del trofotodermo utilizando anticuerpos anti-ratón. Estas células muertas, en presencia de Ioduro de propidio se tiñen de color rojo. Las células que permanecen vivas, las células de la masa interna celular, en presencia de Hoechst 33342, se tiñen de azul.

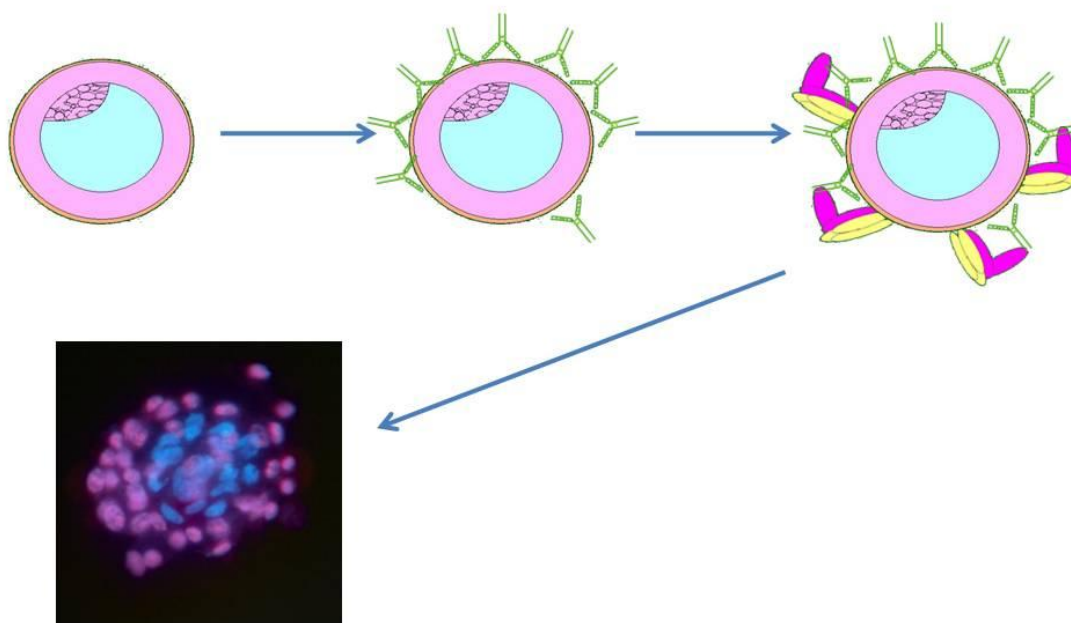


Fig. 29 Desarrollo experimental de la tinción diferencial células masa interna celular (ICM)/ trofoectodermo (TE)

Brevemente el proceso fue el siguiente, se desnudaron los blastocistos digiriendo la zona pelúcida con Pronasa (P8811, Sigma) Los embriones desnudados se lavaron en M2 y se pusieron en medio KSOM en el que se había diluido (1:9) anticuerpos anti-ratón desarrollados en conejo, durante 30 min a 37°C. Posteriormente los embriones se lavaron 3 veces en M2 y se transfirieron a KSOM que contenía complemento, en dilución 1:10, junto con Hoechst 33342 (10 µg/ml) y IP (1 µg/ml) manteniéndolos en esta solución durante 30 min a 37°C. Finalmente se colocaron en un porta objetos sobre 10 µl de una mezcla Hoechst, IP y Vectashield, como agente anti-fading.

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES A HEMBRAS PSEUDOGESTANTES

Para analizar la capacidad de implantación de los embriones transportados en las distintas condiciones y, por tanto, la eficiencia real del proceso, se transfirieron estos embriones a hembras pseudogestantes CD-1 (Harlan Ibérica) en día 0,5 de pseudogestación, a través del infundíbulo (Fig. 27). Las hembras receptoras fueron sacrificadas 14 días después y el número de fetos y reabsorciones analizado.

ANÁLISIS POR RT-qPCR

Para conocer en profundidad a nivel molecular que sucede durante el proceso de transporte, se decidió evaluar una batería de genes relacionados con diferentes fenómenos, apoptosis (*Bax*, *Bcl2*), implantación y comunicación intercelular (*Gaj1*), extensión de telómeros (*Terf1*), retrotransposones (*Iap* y *MuERV-L*), metabolismo (*Gadph*) y pluripotencia (*Nanog*, *Pouf51*). Los análisis llevados a cabo, en estadio de blastocisto, consistieron en la cuantificación de los transcritos correspondientes a los genes citados tras el proceso de transporte y cultivo hasta blastocisto.

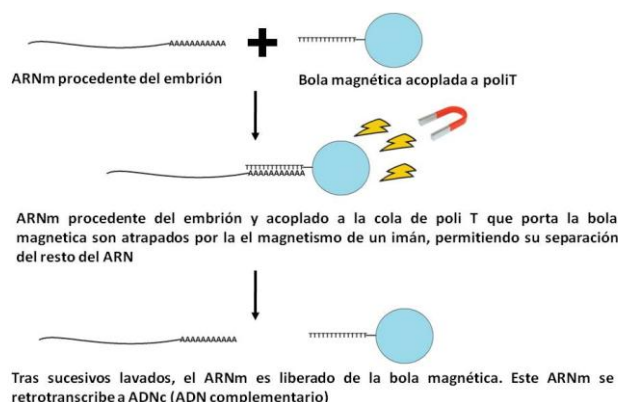


Fig. 30 Proceso de extracción de ARN mensajero procedente de embriones mediante bolas magnéticas.

De esta manera se podrían relacionar los fenómenos macroscópicos (desarrollo a blastocisto tras el transporte, número de células de ICM/TE, implantación *in vivo*) y moleculares (niveles de transcritos).

Tres replicas de 10 blastocistos cada una de ellas fueron el tamaño muestral tomado para llevar a cabo este análisis. Se realizó el aislamiento de ARNm utilizando el Kit Dynabeads mRNA Purification kit (Invitrogen). Este kit está indicado en aquellas circunstancias en las que la cantidad de muestra biológica es muy pequeña (número bajo de células, poco tejido...). El principio químico en que se fundamenta este aislamiento, consiste en la unión del ARN mensajero, a través de la cola de poliA, a unas bolitas magnéticas que llevan adheridas una cola de poliT (Fig. 30). Los ARN mensajeros anclados a la cola de poliT por complementariedad son arrastrados por la acción de un pequeño campo magnético (imán)

suministrado en el kit por el fabricante. Una vez el ARN es extraído se puede congelar a -80°C hasta su posterior análisis.

Tabla 6 Oligonucleótidos utilizados en qPCR

SimboloGen	Nombre Oficial	Oligonucleótidos Secuencia (-)	Tamaño Fragmento (bp)	Gene Bank accesion nº
Bax	BCL2-associated X protein	5' CTACTTTGCCAGCAAACCTGG 3' TCCCAAAGTAGGAGAGGA	159	NM_007527.3
Bcl2	BCL2-like 1	5' GGAGCTGGTGGTTGACTTTC 3' CTAGGTGGTCATTGAGTAAG	517	NM_009743.4
MuERV1	Murine endogenous retrovirus-L	TGCTTGGGCTCAGCAACATGG GACAGAATGCCTCATCTATCGT	278	XM_001478088.1
IAP	Intracisternal-A particle	GGGTATTGTTGAGCGTGCGC TCGGGTGAGTCTTTCTGGTAC	333	XM_001477167.1
Terf1	Telomeric repeat binding factor 1	TTCAACAACCGAACAAGTGTC 3'TCTCTTTCTCTTCCCCCTCC	215	Mm 4306
Cx43 (Gaj1)	Gap junction membrane channel protein alpha 1	5'TACCACGCCACCACTGGCCCA 3'ATTCTGGTTGTCGTCGGGGAATC	290	Mm 4504
Nanog	Nanog homeobox	5'AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG 3'CAACCACTGGTTTTCTGCCACCG	363	Mm 6047
Oct3/4 (Pou5f1)	POU domain, class 5, transcription factor 1	5'GGAGAGGTGAAACCGTCCCTAGG 3'AGAGGAGGTTCCCTCTGAGTTGC	312	Mm 17031
Gapdh	Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase	5'GGGTGTGAACACGAGAAATATGA 3'CCTTCCACAATGCCAAAGT	250	Mm 379644
H2az	Histone H2az	5'TGTGTACAGCGCAGCCATCCTG 3'CTTCCGATCAGCGATTGTGG	208	NM_016750.2

El siguiente paso es la conversión de los ARN mensajeros en ADN complementario (ADNc). Para ese proceso se utiliza una enzima, la retrotranscriptasa inversa (Superscript III, Invitrogen) que sintetiza la hebra complementaria al ARN en código ADN (Fig. 31). Tras someter a determinadas temperaturas el coctel de reacción, los ADN complementarios están disponibles para su cuantificación.

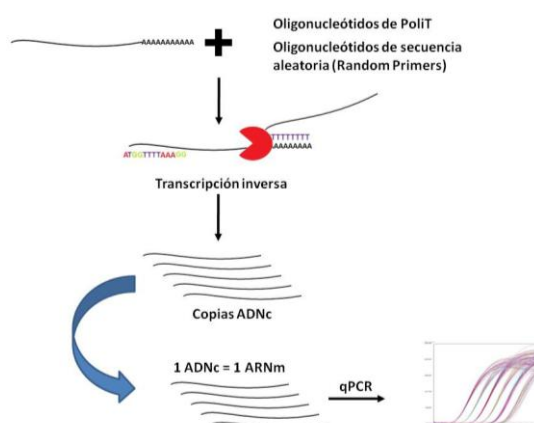


Fig. 31 Proceso de transcripción inversa y cuantificación de transcritos mediante qPCR.

La cuantificación se lleva a cabo en un termociclador del tipo RotorGene 2000 Real Time Cycler™ (Corbett research, Sydney, Australia) utilizando SYBR Green (Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU). La mezcla de reacción (20 µl) contenía 2,5 µl 10X Buffer, 3 mM MgCl₂, 2

U Taq Express (MWGAG Biotech, Ebersberg, Germany), 100 mM de cada dNTP y 0,2 μ M de cada primer (Tabla 6). SYBR Green se aplicó en dilución 1:3000, de un stock de 10000X) el perfil de reacción fue el que se observa a continuación (Fig. 30).

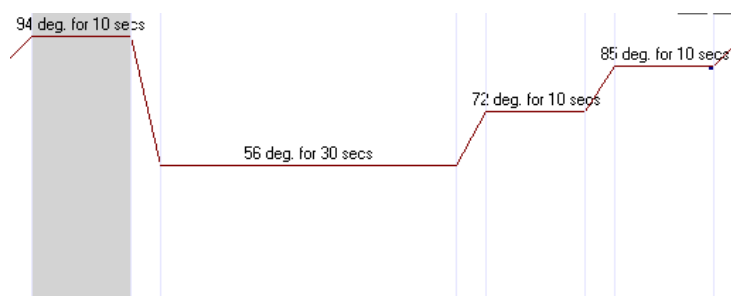


Fig. 32 Perfil de temperaturas utilizado durante las reacciones de qPCR

El método de cuantificación utilizado fue el denominado el de comparación de número de ciclo (comparative Ct method). Cada amplificación fue normalizada con respecto a un gen de cuyos niveles de transcripción sean independientes del tratamiento y dependiente de la cantidad de ARN extraído. En este caso, se utilizó Histona H2afz. De esta manera se minimizan las diferencias entre muestras debidas a la eficiencia de la extracción o de la retrotranscripción.

ESTADÍSTICA

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el software SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA). Todos los datos se reflejan en su forma de media \pm error estándar. En aquellos casos en los que las proporciones comparadas no seguían una distribución normal de frecuencias, se procedió a la normalización de los datos mediante la aplicación de la ecuación arcoseno. Todas las comparaciones realizadas entre grupos siguieron un análisis de la varianza (ANOVA) con un test post-hoc tipo Student-Knewman-Kleus.

RESULTADOS

Experimento 1 Transporte durante 24 y 48 h obtenidas in vivo. Análisis de los niveles de transcripción de genes relacionados con el desarrollo embrionario en blastocistos obtenidos el transporte durante 48 horas de mórulas obtenidas in vivo.

Desarrollo en Cultivo in vitro post-transporte

Durante las 24 h de transporte a las que fueron sometidos los embriones, no se comprobó ningún efecto adverso, en su capacidad de desarrollo posterior *in vitro*. El grupo control presentó una tasa de desarrollo cercana al 100%, mientras que embriones que habían sido mantenidos en transporte en KSOM-H a 15°C, presentaron un desarrollo de entorno al 70%, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 33). Por su parte prolongar el transporte a 48 h, la tasa de desarrollo de los embriones mantenidos a 15°C descendió al 60%, un valor estadísticamente diferente del grupo control. Los mayores valores de desarrollo se observaron en embriones mantenidos a 37°C en KSOM con medias superiores, aunque no estadísticamente diferentes de las de KSOM-Hepes a 37° o 4° en cualquiera de los dos medios. Ninguno de estos cuatro grupos difería de los valores obtenidos en el grupo control

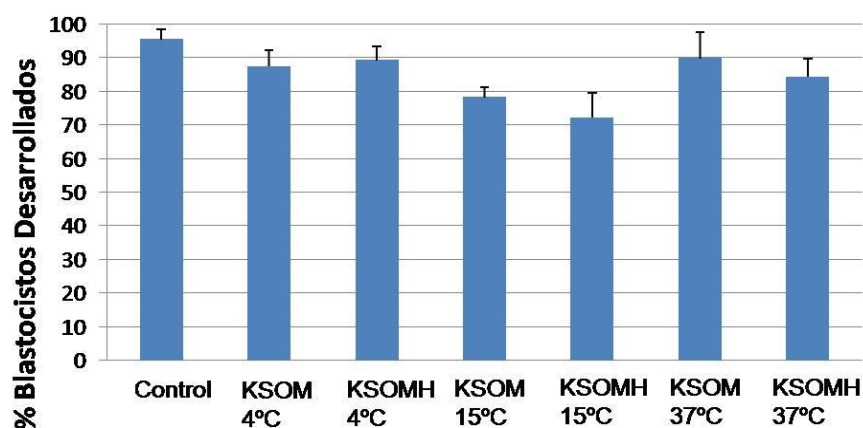


Fig. 33 Desarrollo de mórulas (desarrolladas *in vivo*) y almacenadas durante 24 h en KSOM y KSOM-H a 4°, 15° y 37°C. Los valores representados son el valor medio \pm error estándar. No hubo diferencias significativas entre tratamientos. El análisis estadístico realizado fue un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un estudio post hoc tipo Student-Newman-Kleus

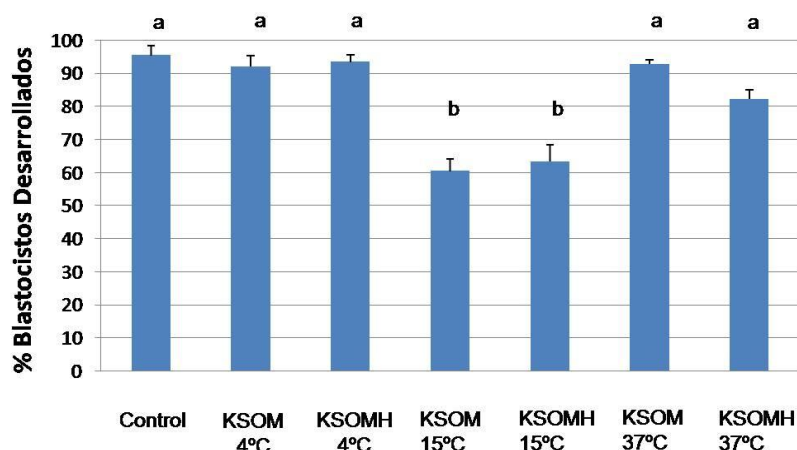


Fig. 34 Desarrollo de mórulas (desarrolladas *in vivo*) y almacenadas durante 48 h en KSOM y KSOM-H a 4°, 15° y 37°C. Los valores representados son el valor medio \pm error estándar. Las diferencias significativas se representan por diferentes letras. El análisis estadístico realizado fue un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un estudio post hoc tipo Student-Newman-Kleus

Análisis del número de células de ICM y TE

Para evaluar la calidad de los embriones después del transporte, se determinó el número de células de cada uno de los linajes que componen el embrión en estadio de blastocisto, masa interna celular (ICM) y trofotodermo (TE). Todos los tratamientos tras 24 horas de transporte mostraron un descenso significativo en el número de células en la ICM y TE comparándolos con el grupo control (Fig. 35). Por lo que en base a este parámetro tras 24 h de transporte, ninguno de los tratamientos ensayados mostraba ventajas que justificaran su elección.

Tras 48 h de transporte, el número de células de la ICM descendió significativamente a 15°C y 37°C (tanto en KSOM como en KSOM-H) comparándolo con el grupo control. El número de células para el grupo de 4°C en cambio fue estadísticamente similar al observado en el grupo control. En este estudio sí que se apreciaron diferencias significativas entre el medio KSOM Equilibrado y KSOM-Hepes en el transporte a 37°C, con valores superiores respecto al número de células en el primer caso. El número de células del trofotodermo descendió con respecto al grupo control en los tratamientos a 15°C y 37°C.

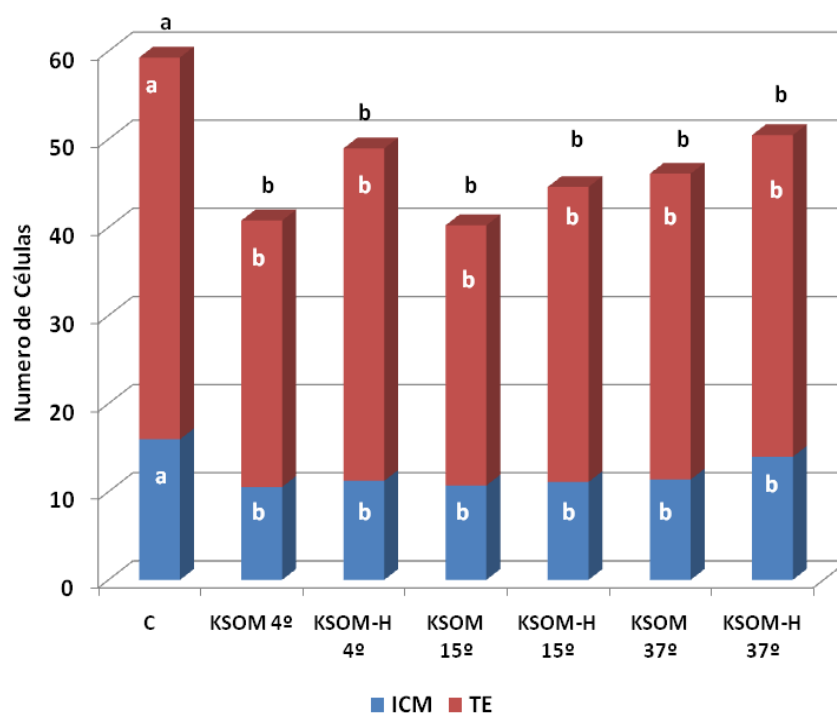


Fig. 35 Número de células de la ICM, TE y número total de células procedentes de blastocistos desarrollados después de haber transportado durante 24 h, mórulas desarrolladas *in vivo*. Los valores representados son el valor medio \pm error estándar. Las diferencias significativas se representan por diferentes letras. El análisis estadístico realizado fue un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un estudio post hoc tipo Student-Newman-Kleus

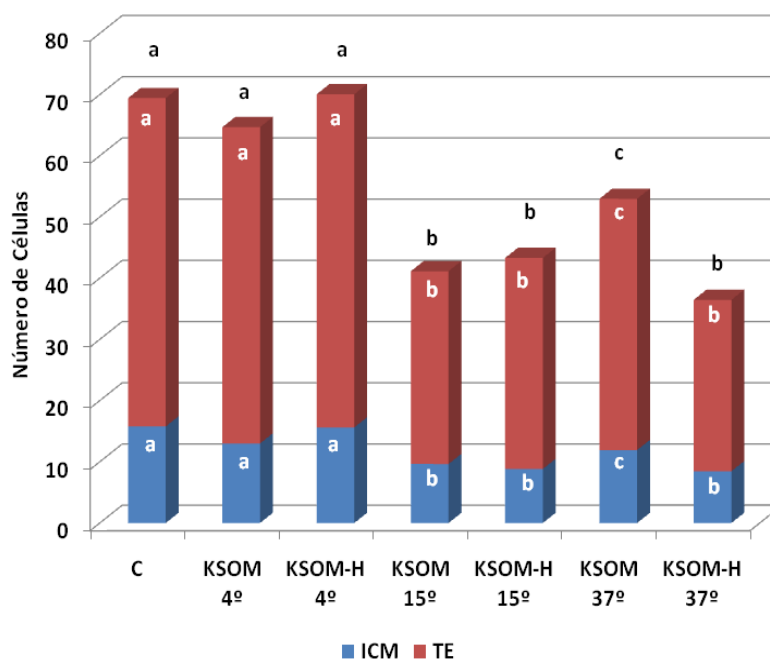


Fig. 36. Numero de células de la ICM, TE y número total de células procedentes de blastocistos desarrollados después de haber transportado durante 48 h, mórulas desarrolladas *in vivo*. Los valores representados son el valor medio \pm error estándar. Las diferencias significativas se representan por diferentes letras. El análisis estadístico realizado fue un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un estudio post hoc tipo Student-Newman-Kleus

Transferencia de embriones a hembras pseudogestantes

Los porcentajes de desarrollo *in vivo* de los embriones transportados durante 24 h tras su transferencia a hembras pseudogestantes, medidos en base al número total de fetos implantados con los diferentes tratamientos ensayados fueron semejantes en todos los grupos. El grupo control presentó un porcentaje de implantaciones del 58% (Fig. 37) mientras que la viabilidad embrionaria osciló desde el 41% (KSOM a 15°C) hasta el 66% (KSOM-H a 15°C), sin diferencias significativas entre las condiciones ensayadas. Sin embargo, si existió un incremento, no significativo, en el número de reabsorciones en el grupo de KSOM a 15°C (39%) frente al grupo control (16%)

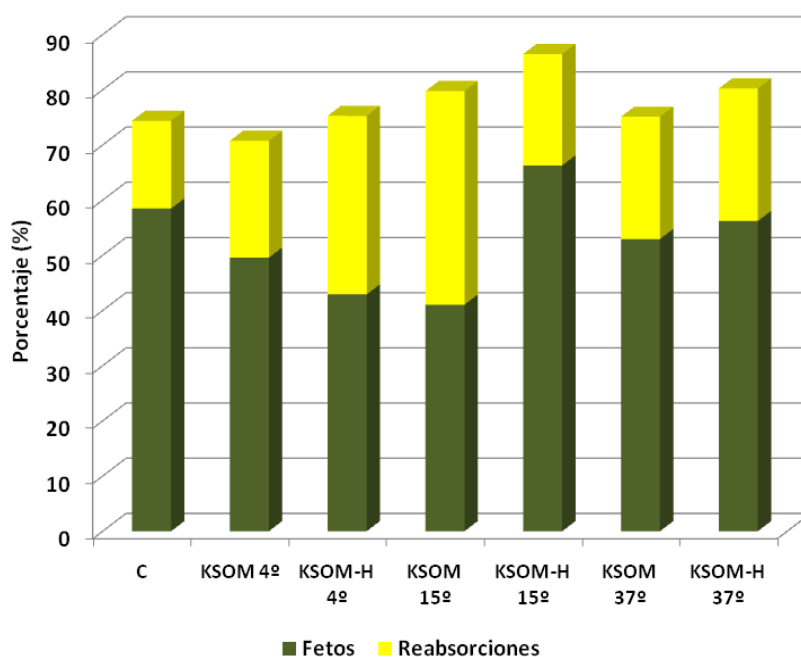


Fig. 37 Número de fetos, reabsorciones e implantaciones totales después de 14 días de gestación de las transferencias realizadas a hembras pseudogestantes (0,5 dpc) de mórulas (desarrolladas *in vivo*) y transportadas durante 24 h. Los valores representados son el valor medio \pm error estándar. No hubo diferencias significativas entre tratamientos. El análisis estadístico realizado fue un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un estudio post hoc tipo Student-Newman-Kleus

Las transferencias realizadas tras un transporte de 48 h, dieron todos ellos unos valores significativamente inferiores que el del valor control en todos los casos. En la comparativa entre diferentes tratamientos el descenso en el porcentaje de implantación en el tratamiento a 15°C fue más marcado en los dos medios de cultivo ensayados. El fracaso en estas condiciones desaconseja su utilización en envíos de embriones durante 48 h. Con respecto al resto de tratamientos analizados, puesto que el porcentaje de reabsorciones fue similar en los tratamientos a 4º C y 37°C (excepto KSOM a 37°C) y el porcentaje de fetos recuperado era similar, no hay ningún valor estadístico que permita seleccionar un tratamiento de elección para el envío de embriones en estadio de mórula durante 48 h

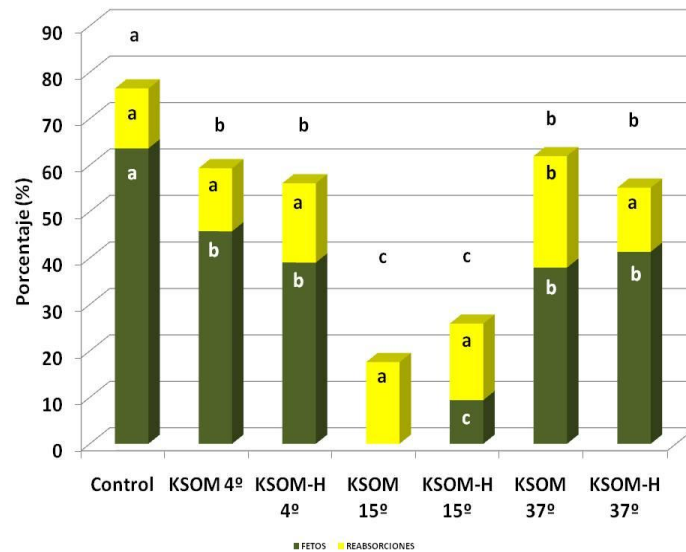


Fig. 38 Porcentaje de fetos, reabsorcciones e implantaciones totales obtenidas el día 14 de gestación de hembras a las que le fueron transferidas mórulas (desarrolladas *in vivo*) y transportadas durante 48 h. Los valores representados son el valor medio \pm error estándar. Las diferencias significativas se representan por diferentes letras. El análisis estadístico realizado fue un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un estudio post hoc tipo Student-Newman-Kleus

Análisis de los niveles de transcripción de genes relacionados con el desarrollo

Se analizó la cantidad relativa de transcritos de genes relacionados con apoptosis (*Bax*, *Bcl2*), pluripotencia (*Pouf51*, *Nanog*), expresión de retrotransposones (*MuERV-L*, *lap*), extensión de telómeros (*Terf1*), adhesión celular (*Gajl*) y metabolismo (*Gapdh*). La expresión del gen proapoptótico *Bax*, no vio afectada su expresión en ninguno de los tratamientos ensayados; sin embargo, la expresión del gen antiapoptótico *Bcl-2*, si vio regulado a la baja sus niveles de expresión, comparándolos con el grupo control (Fig 39).

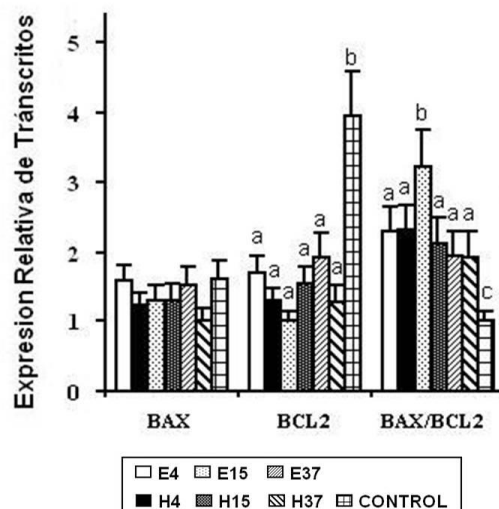


Fig. 39. Expresión relativas de transcritos relacionados con apoptosis analizados en blastocistos desarrollados después de 24 h de cultivo procedentes de mórulas desarrolladas *in vivo* y transportadas durante 48 h. Los valores representados son el valor medio \pm error estándar. Las diferencias significativas se representan por diferentes letras. El análisis estadístico realizado fue un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un estudio post hoc tipo Student-Newman-Kleus

La proporción *Bax/Bcl-2* estaba alterada en todos los tratamientos con respecto al control, lo que indica la existencia de procesos apoptóticos en todos ellos durante el transporte, especialmente en el caso del grupo de KSOM a 15°C, el cual mostró el mayor nivel de expresión. El retrotransposón MuERV-L fue regulado al alza en los grupos KSOM y KSOM-H a 15°C. *Iap*, por otra parte, mostró un incremento en sus niveles de expresión dentro del grupo de KSOM-H a 4°C (Fig 40).

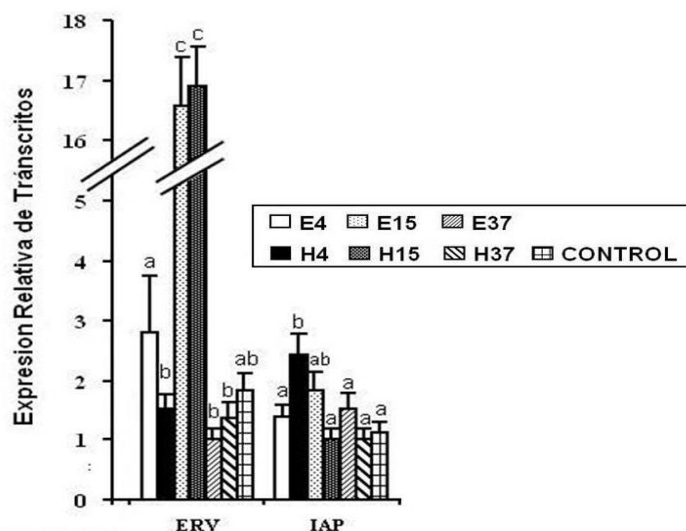


Fig. 40 Expresión relativas de transcritos relacionados con retrotransposones analizados en blastocistos desarrollados después de 24 h de cultivo procedentes de mórulas desarrolladas *in vivo* y transportadas durante 48 h. Los valores representados son el valor medio \pm error estándar. Las diferencias significativas se representan por diferentes letras. El análisis estadístico realizado fue un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un estudio post hoc tipo Student-Newman-Kleus

Gaj1 (Connexin 43) mostró un descenso en los niveles de transcripción en los tratamientos a 15°C y 37°C tanto en KSOM como en KSOM-H. Un patrón similar se mostró en el caso de Pouf51 (*Oct 3/4*), afectando preferencialmente a los grupos KSOM a 15°C y KSOM/ KSOM-H a 37°C. *Gadph* fue regulado a la baja en los grupos KSOM-H a 15°C y KSOM/KSOM-H a 37°C (Fig. 41).

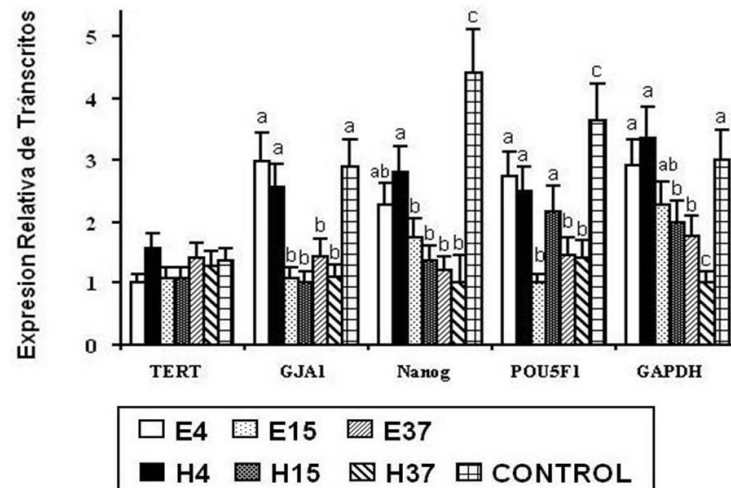


Fig. 41 Expresión relativas de transcritos relacionados con pluripotencia, comunicación intercelular y metabolismo analizados en blastocistos desarrollados después de 24 h de cultivo procedentes de mórulas desarrolladas *in vivo* y transportadas durante 48 h. Los valores representados son el valor medio \pm error estándar. Las diferencias significativas se representan por diferentes letras. El análisis estadístico realizado fue un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un estudio post hoc tipo Student-Newman-Kleus

Experimento 2 Transporte durante 24 h de mórulas desarrolladas *in vitro*.

Desarrollo en Cultivo *in vitro* post- transporte

Recolectados los cigotos a 0,5 dpc, tras un cultivo *in vitro* de 72 h de duración, las mórulas obtenidas fueron sometidas a las condiciones de transporte descritas anteriormente. Tras el transporte, se evaluó, como en los experimentos anteriores, la eficiencia del proceso en función del grado de desarrollo de los embriones.

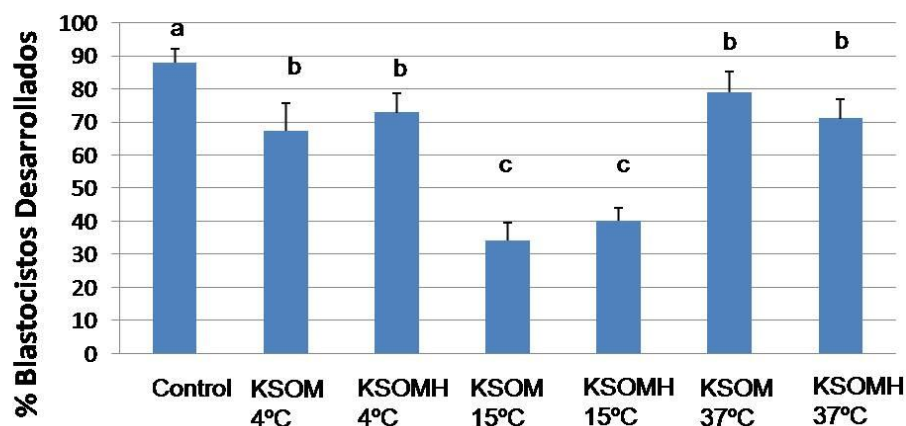


Fig. 42. Desarrollo de mórulas (desarrolladas *in vitro*) y almacenadas durante 24 h en KSOM y KSOM-H a 4°, 15° y 37°C. Los valores representados son el valor medio \pm error estándar. Las diferencias significativas se representan por diferentes letras. El análisis estadístico realizado fue un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un estudio post hoc tipo Student-Newman-Kleus

La viabilidad se vio comprometida de forma diferente a los casos anteriores. De esta forma, mientras que el grupo control mostró un grado de desarrollo a blastocisto del 90% (Fig. 42), mantener los embriones a 4°C (tanto en KSOM como en KSOM-H) resultó en un 70% de viabilidad final. La diferencias más destacadas en la viabilidad embrionaria se mostraron solamente en los grupos mantenidos a 15°C, donde las tasas de desarrollo descendieron al 30% y 40% (KSOM y KSOM-H, respectivamente)

Análisis del número de células de ICM y TE

El número de células de la ICM descendió en 3 tratamientos diferentes: KSOM a 4°C, KSOM-H a 15°C y 40°C. En todos los casos, el número de estas células fue más bajo que en el conjunto de experimentos *in vivo*, como consecuencia del cultivo *in vitro*.

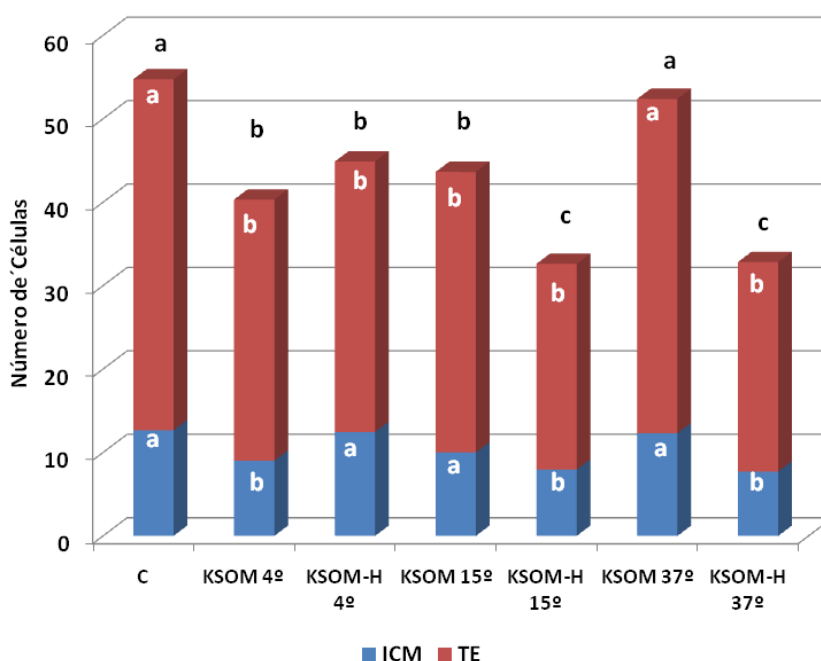


Fig. 43. Número de células de la ICM, TE y número total de células procedentes de blastocistos desarrollados después de haber transportado durante 24 h, mórulas desarrolladas *in vitro*. Los valores representados son el valor medio \pm error estándar. Las diferencias significativas se representan por diferentes letras. El análisis estadístico realizado fue un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un estudio post hoc tipo Student-Newman-Kleus

El número de células en el trofotodermo disminuyó para todos los tratamientos en comparación con el grupo control (excepto en el grupo de KSOM a 37°C). En este caso descrito, la alcalinización del medio podría haber afectado a ambos tipos celulares y ser el motivo de su descenso. Como consecuencia, el número total de células disminuyó en todos los grupos, a excepción del grupo de KSOM a 37°C. En el grupo de KSOM-H a 15°C y 37°C se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo control. La proporción de ICM/ número total de células se mantuvo en todos los tratamientos,

Transferencia de embriones a hembra pseudogestante

En el grupo control la tasa de fetos recuperados fue del 31% (Tabla), indicando una baja eficiencia en el proceso de transferencia debido al cultivo. En todos los tratamientos ensayados, la tasa de fetos recuperada fue similar al grupo control, exceptuando los grupos KSOM y KSOM-H a 15°C. En aquellos casos, la tasa descendió hasta el 14% y 5% (KSOM y KSOM-H a 15°C, respectivamente). Las reabsorciones obtenidas fueron significativamente diferentes cuando se compararon con el control y el resto de tratamientos, incrementándose a 15°C y 37°C. No hubo diferencias en el número de implantaciones totales.

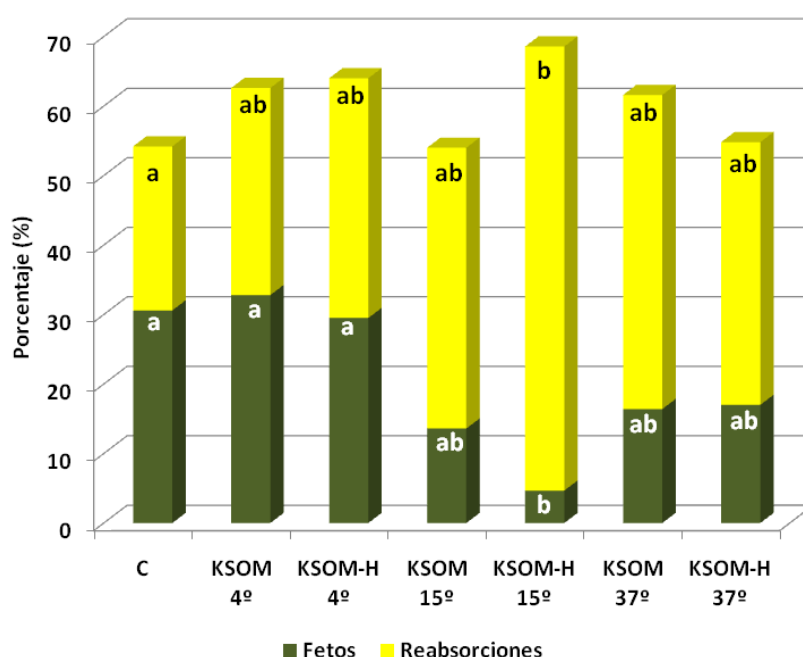


Fig. 44. Número de fetos, reabsorciones e implantaciones totales después de 14 días de gestación de las transferencias realizadas a hembras pseudogestantes (0,5 dpc) de mórulas (desarrolladas *in vitro*) y transportadas durante 24 h. Los valores representados son el valor medio \pm error estándar. Las diferencias significativas se representan por diferentes letras. No hubo diferencias significativas entre tratamientos para el porcentaje total de implantaciones (fetos + reabsorciones). El análisis estadístico realizado fue un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un estudio post hoc tipo Student-Newman-Kleus

Experimento 3 Mórulas desarrolladas in vivo son transportadas en el interior del oviducto durante 24 h.

Como alternativa al transporte de embriones planteados hasta el momento en esta Tesis Doctoral, se planteó una tercera opción técnicamente más sencilla: la posibilidad de enviar los embriones en estadio de mórula dentro del oviducto. En este caso se utilizó exclusivamente la temperatura de refrigeración (4°C). Se desestimó la posibilidad de realizar este transporte a temperaturas de cultivo (37°C) dada la rápida autólisis de los tejidos de ratón a esta temperatura (Miao et al., 2007). La temperatura de 15°C se desechó por haber mostrado una cierta desventaja en cuanto a viabilidad en los estudios anteriores

Desarrollo en Cultivo in vitro post- transporte

Tras realizar el transporte de mórulas dentro del oviducto durante 24 h, estas se recolectaron lavando los oviductos y se pusieron en cultivo durante 24-36 h Posteriormente se evaluó el desarrollo hasta blastocisto. Se comprobó que estos embriones eran capaces de desarrollarse hasta blastocisto sin problema, no existiendo diferencias significativas con el control (sin transporte) ni con el grupo de transporte sin oviducto (Fig. 45).

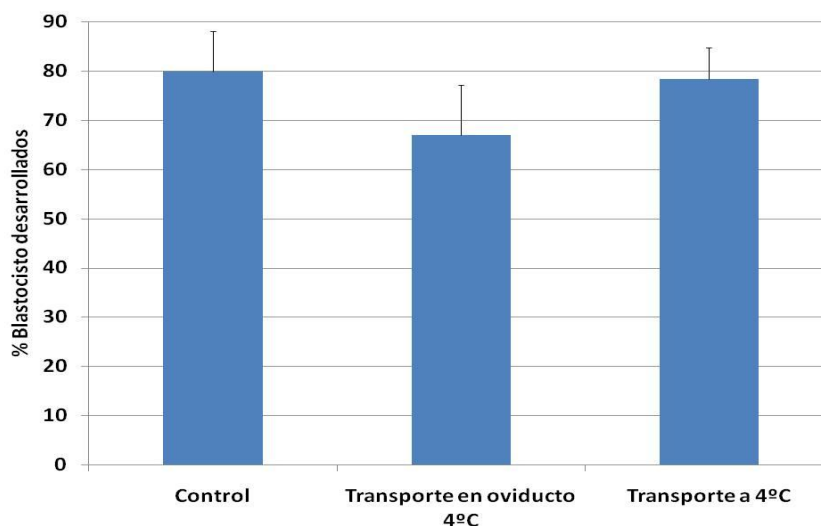


Fig. 45 Desarrollo de mórulas (desarrolladas *in vivo*) y transportadas durante 24 h dentro del oviducto en KSOM-H a 4°C. Los valores representados son el valor medio \pm error estándar. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos ensayados. El análisis estadístico realizado fue un análisis de la varianza (ANOVA).

Análisis del número de células de ICM y TE

En cuanto al número de células, el transporte no afectó al desarrollo de los embriones observándose mismo número de células (Fig. 46) en los tres casos ensayados, demostrándose por tanto la idoneidad del método al menos en términos de desarrollo en cultivo.

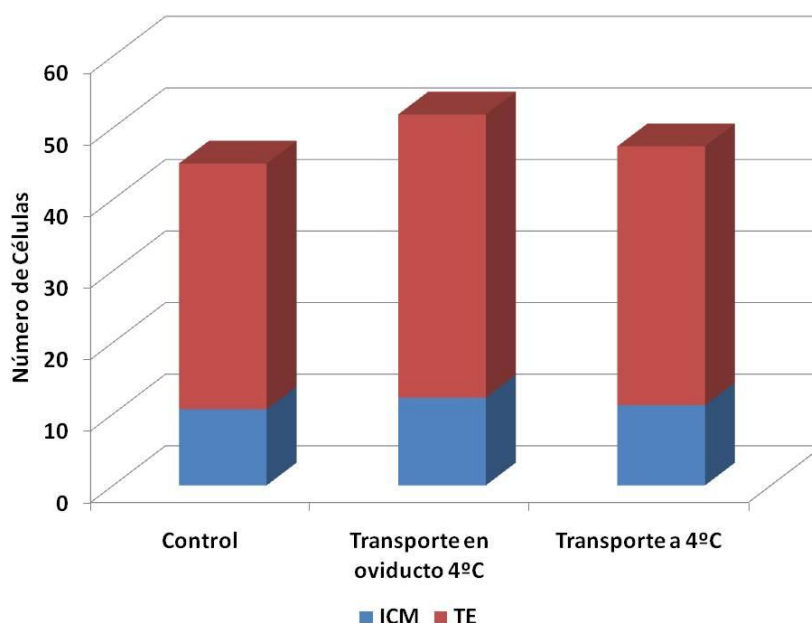


Fig. 46. Número de células de la ICM, TE y número total de células procedentes de blastocistos desarrollados después de haber transportado durante 24 h contenidos en el oviducto. Los valores representados son el valor medio \pm error estándar. Las diferencias significativas se representan por diferentes letras. El análisis estadístico realizado fue un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un estudio post hoc tipo Student-Newman-Kleus

Transferencia de embriones a hembra pseudogestante

A la vista de los resultados de desarrollo in vitro y como confirmación de los mismos se procedió a la transferencia a hembra pseudogestante justo después del periodo de transporte. Este procedimiento puso en evidencia la marcada pérdida de viabilidad de los embriones transportados dentro de los oviductos, y que ni el desarrollo in vitro ni la determinación del número de células habían sido incapaces de evidenciar. Si bien el número de implantaciones era similar entre todos los grupos comparados (no existiendo diferencias significativas entre ellos), el número de reabsorciones se incrementaba significativamente en el grupo de embriones transportado en el oviducto (Fig. 47).

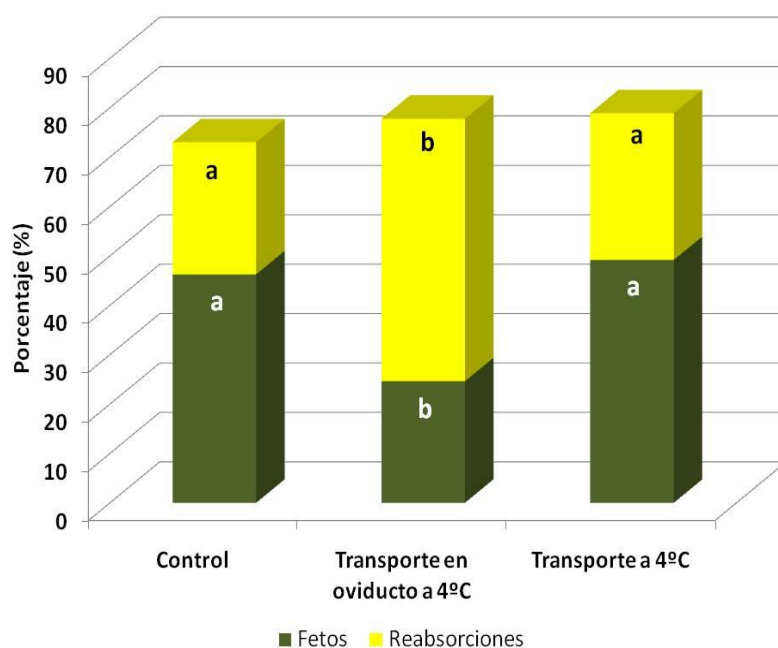


Fig. 47 Porcentaje de fetos, reabsorciones e implantaciones totales después de 14 días de gestación de las transferencias realizadas a hembras pseudogestantes (0,5 dpc) de mórulas transportadas durante 24 h dentro del oviducto a 4°C y fuera del oviducto, en medio KSOM-H. Los valores representados son el valor medio \pm error estándar. Las diferencias significativas se representan por diferentes letras. No hubo diferencias significativas en el porcentaje total de implantaciones entre tratamientos. El análisis estadístico realizado fue un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un estudio post hoc tipo Student-Newman-Kleus

DISCUSIÓN

En este estudio hemos simulado el transporte/almacenaje de embriones de ratón en el estadio de mórula con el fin de explorar las condiciones óptimas para el intercambio de este tipo de material biológico entre laboratorios.

El transporte de embriones es una alternativa viable para el transporte de organismos modificados genéticamente por diversas razones. En primer lugar, el transporte de animales vivos cuyo genoma se ha modificado tiene el riesgo, aunque remoto, de una liberación involuntaria al medio ambiente. En segundo lugar, la normativa y los trámites administrativos, necesarios para llevar a cabo el transporte de animales vivos, es más complejo y enlentece todo el proceso. En tercer lugar y más importante, la admisión de un animal vivo en una instalación es un riesgo sanitario que puede comprometer a toda la instalación en caso de que los controles sanitarios no se hubiesen efectuado convenientemente o si se hubiera escapado un falso negativo. Por el contrario la rederivación de los embriones transportados, mediante transferencia a hembras pseudogestantes, hace que esos riesgos se minimicen o desaparezcan. Además, existe un cuarto componente de bienestar animal que no debe obviarse, el estrés al que están sometidos los animales vivos cuando son transportados.

El intercambio de animales a través del transporte de embriones congelados ha supuesto la necesidad de poner a punto protocolos de congelación y requiere sistemas de almacenamiento en los centros de origen y destino así como de transporte en tanques secos de LN₂ con el consiguiente coste en infraestructura. En resumen, el transporte en estas circunstancias requiere de unas condiciones y herramientas que en muchas ocasiones están por encima de los costes que un animalario puede soportar. Además no debemos olvidar que la criopreservación implica una leve pérdida de viabilidad respecto a los embriones frescos (Honadel and Killian, 1988; Van den Abbeel and Van Steirteghem, 1987). Por todo ello disponer de una alternativa técnica más sencilla al transporte tanto de animales vivos como de embriones congelados, tiene un indudable interés.

El transporte de embriones congelados de ratón es realizado de forma eficiente desde hace varios años (Whittingham et al., 1972), y es la base de distribución en repositorios internacionales como EMMA o Jackson. Sin embargo, algunas de las ventajas de los métodos que no utilizan la congelación como forma de conservación y transporte para distancias cortas y tiempos no muy prolongados, son los bajos costes del proceso y que no requieren de equipos sofisticados ni costosos. Estos métodos han sido perfeccionados (Anderson and Foote, 1975a; Anderson and Foote, 1975b; Kachilele and New, 1988; Syms et al., 1985). Nuestro objetivo ha sido simplificar al máximo el protocolo intentando obtener altas eficiencias y definir la viabilidad en base al único parámetro realmente fiable, la viabilidad *in vivo*, es decir el número de animales vivos tras la transferencia.

Los estudios realizados hasta la fecha han revelado que los embriones en estadio de mórula han sido los que mejores resultados han dado a la hora de transportar embriones. Así, (Miyoshi et al., 1992) reportaron una viabilidad en cultivo entre 57,2% hasta un 81,9%, tras almacenar mórulas a 0°C en un medio conteniendo sacarosa, descendiendo el porcentaje de viabilidad con el tiempo de almacenaje. Consiguieron neonatos con una porcentaje del 29,9% a las 72 h de almacenaje. Si bien es cierto, la conservación de embriones en estadios más tempranos del desarrollo es posible, como ya demostró Kamimura (Kamimura et al., 2003), quien fue capaz de transportar embriones en 2 células dentro de sus propios oviductos a 4°C. Estableció también una relación inversamente proporcional con el tiempo de almacenaje y demostró que la viabilidad de los embriones en cultivo era de entre un 18,7 hasta un 68,3% (60 h máximo de almacenaje). La tasa de neonatos fue del 20% a las 36 h de transporte. En el trabajo que aquí presentamos, se ha querido abrir la posibilidad a un sistema de almacenaje y/o transporte mucho más amplio en cuanto a temperaturas y medios.

De los resultados del primer experimento, en donde embriones en estadio de mórula procedentes del desarrollo en el oviducto materno son transportados (durante 24 y 48 h) destaca que 24 h no es tiempo suficiente para alterar la fisiología del embrión en cuanto a su capacidad de desarrollo posterior *in vitro*. Sin embargo, la calidad de estos embriones cuando se han desarrollado a blastocisto difirió significativamente respecto al control en base al número de células. Esto quiere decir que presentan alteraciones que hacen que el desarrollo celular progrese más lentamente pero este efecto es recuperable si en vez de hacer el cultivo *in vitro*, los embriones se transfieren a hembras pseudogestantes, donde logran implantarse y desarrollarse con la misma eficiencia que los embriones control.

El mantenimiento de las condiciones de transporte durante 48 h demostró ser suficiente para alterar de forma significativa a los embriones mantenidos a 15°C. El cultivo posterior al transporte mostró una alteración en el desarrollo a blastocisto a esa temperatura. El número de células cayó significativamente con respecto al control y a los tratamientos a 4°C. Este comportamiento ya fue reportado por Lindner (1983) (Lindner et al., 1983) en sus experimentos. La posible justificación puede radicar en que a 4° se haya logrado inducir un estado de diapausa (Nakamura and Tsunoda, 1992; Sakurai et al., 2005) y que permitiría a los embriones mantener una mayor viabilidad frente a otras temperaturas. Tanto los embriones mantenidos a 37°C como a 15°C mostraron un número significativamente inferior de células que los de 4 grados tras el cultivo *in vitro*. Sin embargo tras la transferencia se marca una clara diferencia entre los grupos a 15°C y a 37°C logrando éstos últimos unos porcentajes de embriones viables semejantes a los mantenidos a 4°C. De alguna manera en este caso las condiciones de desarrollo *in vivo* son capaces de compensar los daños que se han manifestado *in vitro* en forma de una disminución del número de células, pero no ocurre lo mismo con los mantenidos a 15°C, 48 h donde el cultivo *in vivo* es incapaz de compensar el deterioro

metabólico experimentado. Se puede decir que los procesos irreversibles que tienen lugar a 15°C hacen que sea inviable el embrión desde el punto de vista de su desarrollo.

Nuestros datos también ponen en evidencia las limitaciones de la evaluación morfológica y que requiere de análisis adicionales que aseguren su viabilidad implantacional (Cheng et al., 2008; Depa-Martynow et al., 2007; Lindner and Wright, 1983; Matos et al., 2009; Romao et al.). El grupo de 15°C en el primer experimento es un claro ejemplo. Mientras que presentaba capacidad de desarrollo en cultivo, estos embriones no eran capaces de implantarse, o si lo hacían experimentaban un mayor índice de fracaso en su desarrollo postimplantacional, traducido en una mayor incidencia de reabsorciones y una menor cantidad de fetos vivos. Dado el importante efecto observado tras 48 h de transporte se decidió analizar a nivel transcripcional algunos genes importantes para el desarrollo del embrión tras estas condiciones de transporte no controlado. El análisis de los niveles de transcripción reveló alteración en algunos genes importantes para el desarrollo del embrión ya tras 24 h de cultivo *in vitro*, cuando todavía se trata de efectos compensables en el momento en que se retorna a unas condiciones optimas de cultivo, como es el tracto materno tras la transferencia

Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) es un gen implicado en procesos de permeabilización mitocondrial, siendo uno de los inhibidores de la cascada apoptótica mitocondrial. Este gen presentó unos niveles transcripcionales significativamente más bajos que en la situación control. Esta situación favorecería el fenómeno de apoptosis en todos los estadios, ya que es la relación de los niveles de expresión de esta proteína y *Bax*, junto con otros estímulos, la que desencadenará la cascada mitocondria de apoptosis (Korsmeyer et al., 1993; Oltvai et al., 1993; Yin et al., 1994). Puesto que los niveles de *BAX* se mantuvieron en el mismo nivel que la situación control, todos los tratamientos analizados mostrarían unos niveles de transcripción compatibles con fenómenos de apoptosis en el embrión. De entre todos ellos, el grupo KSOM a 15°C, presentó unos niveles significativamente mayores, justificando en parte el fracaso a esta temperatura.

ERV-Ls son elementos retrovirales. Se caracterizan por carecer del gen que codifica para la envuelta del virus (gen *env*). Presenta alta homología con secuencias de retrovirus endógenos humanos. Este tipo de secuencias se caracterizan también por poseer secuencias flanqueantes que facilitan su transposición dentro del genoma, lo que posibilita su alojamiento en regiones codificantes correspondientes a otros genes. *MuERV-L* es uno de los primeros genes que se transcriben en embriones murinos en estadio de una célula (Kigami et al., 2003) y que está altamente transcrito en embriones en estadio de dos blastómeros, pero poco en el estadio de blastocisto (Peaston et al., 2004). Se comprobó una importante regulación al alza de los niveles de expresión de los transcritos de *MuERV-L* en los grupos KSOM y KSOM-H a 15°C. Una desregulación al alza en estos estadios podría estar relacionado con el fracaso tanto en el desarrollo en cultivo como a nivel implantacional como se ha descrito (Ramirez et al.,

2006). Aún hoy, se desconocen cuáles son las alteraciones ligadas a niveles de expresión de retrotransposones durante el desarrollo embrionario e implantacional.

Gja1 (Conexina 43) es un gen implicado en la comunicación célula-célula. Su importancia radica en el establecimiento de las uniones tipo GAP entre células lo que facilita los fenómenos de comunicación así como el transporte de nutrientes entre ellas. Alteraciones en este gen dan lugar a una patología conocida como displasia oculodentodigital, caracterizada por que el individuo presenta un anormal desarrollo ocular, con afectación de la dentición así como por el mantenimiento de membrana interdigital entre el 4º y 5º dedo (Dobrowolski et al., 2009). Los resultados mostraron un mantenimiento de los niveles de expresión a 4°C, sin embargo no sucedió así con el resto de tratamientos. Es posible que la viabilidad posterior de los embriones mantenidos a esta temperatura sea debida a que este gen mantiene sus niveles de transcritos en un rango adecuado para que reactivado el embrión en cultivo prosiga con su desarrollo. Podría existir una relación entre el fenómeno de diapausa y este gen, pudiendo ser uno de los candidatos clave en el mantenimiento de este estado (Hamatani et al., 2004).

Nanog es un gen que se expresa en células madre embrionarias (ESCs) siendo un factor de transcripción clave en el mantenimiento de la pluripotencia. Comprobamos que los tratamientos a 15°C y 37°C hicieron que descendiese los niveles de transcripción de este gen más que a 4°C. Esto supone una pérdida en la capacidad de renovación celular (self renewal), factor clave en el desarrollo del embrión en los primeros estadios antes de la implantación. La temperatura de 4°C podría estar manteniendo la capacidad pluripotente de las células debido a la diapausa térmica inducida. Este fenómeno no estaría sucediendo en el resto de tratamiento, ocasionando los fallos en el desarrollo propios de unos niveles bajos de este transcrito (Purpera et al., 2009; Siu et al., 2008; Yasuda et al., 2006).

Pou5f1 (POU class 5 homebox 1) es un dominio homeo de la familia del factor de transcripción POU, implicado en la renovación de las células madre embrionarias. *Pou5f1* se encuentra activado como factor materno en el ovocito, aunque se mantiene así durante todo del desarrollo preimplantacional. Por esto es necesaria una muy estricta regulación de este factor, ya que pequeñas alteraciones en los niveles pueden promover la diferenciación de las células. En los embriones de ratón, niveles bajos de *Pou5f1*, impiden una correcta formación de la masa celular interna, se pierde la capacidad pluripotente de estas células dando lugar a la formación de trofoectodermo. Esta es la situación que se da en los tratamientos a 15°C, justificando el fallo en la implantación y el desarrollo post-implantacional de estos embriones.

Gapdh es el gen de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Esta enzima cataliza la sexta etapa de la glicólisis, sirviendo como punto de regulación en el metabolismo de la glucosa. Recientemente se han descrito funciones no implicadas en procesos metabólicos, como activador de la transcripción (Berry and Boulton, 2000), inicio de apoptosis (Tarze et al.,

2007) y transporte de vesículas entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Bryksin and Laktionov, 2008). Los niveles de expresión descendieron en los grupos de 15°C y 37°C. Al igual que en otros tipos de genes, el efecto de estos bajos niveles podría estar comprometiendo a nivel metabólico, en esta ocasión, la viabilidad embrionaria.

El efecto del cultivo *in vitro* sobre el embrión ha sido ampliamente descrito (Baltz and Tartia; Melin et al., 2009) tanto en el desarrollo embrionario temprano (Fernandez-Gonzalez et al., 2009; Morgan et al., 2008) como post implantacionales (Fernandez-Gonzalez et al., 2007). Sin embargo, el cultivo *in vitro* puede ser una técnica necesaria en aquellos casos donde no se dispone del personal técnico capaz de obtener los embriones en estadio de mórula mediante lavado del oviducto de la hembra. Por este motivo se planteó este segundo experimento.

En este caso 24 h fueron suficientes como para demostrar que el embrión que ha permanecido en cultivo tras ser sometido a transporte presentaba una capacidad de desarrollo anómala. El grupo de 15°C mostró el índice más bajo de desarrollo llegando apenas al 30%. Si bien es cierto que el resto de tratamientos no se vio afectado de forma tan importante, disminuyeron sus porcentajes. La variabilidad en el número de células que presentaban los blastocistos demostró la heterogeneidad en la calidad de los embriones que se desarrollan en cultivo, lo que unido al proceso de transporte y posterior cultivo hizo que no fuese un marcador adecuado de calidad. Así resultó ser tras ser transferidos a hembra pseudogestante en donde el grupo de 15°C presentó la menor tasa de fetos (5-10%). En todos los casos el porcentaje de reabsorciones fue alto, aunque no significativo con respecto al control. A tenor de los resultados, hacer el estudio a 48h resultaba innecesario ya que sólo podía esperarse un deterioro más marcado de la calidad embrionaria.

La posibilidad de desarrollar embriones en una situación pseudo-fisiológica ha llevado a desarrollar nuevas formas de cultivo. Así, en otras especies como en oveja, los embriones pueden ser cultivados dentro del propio oviducto (Eyestone et al., 1987; Lazzari et al.; Papaioannou and Ebert, 1986; Rizos et al.). La posibilidad de que en determinada situación de emergencia sea necesario transportar embriones y no se disponga del personal adecuado hace que se pueda recurrir a esta metodología. Se decidió realizar este experimento a 4°C ya que la información extraída del resto de estudio hacía presagiar que la máxima eficiencia, de existir la posibilidad, se obtendría bajo estas condiciones.

En este caso, los resultados mostraron un especial comportamiento de los embriones tras someterlos a un transporte dentro de los oviductos. El cultivo *in vitro* posterior mostró unas tasas de desarrollo muy altas, sin embargo cuando los embriones fueron recuperados y transferidos a hembras pseudogestantes, la tasa de implantación fue significativamente menor que el control y que el grupo de embriones transportado a 4°C. En este experimento se agudizó

de manera clara lo observado en el primer experimento con los embriones mantenidos a 15°C a pesar de una perfecta capacidad de desarrollo en cultivo, los embriones no eran capaces de implantarse, o si lo hacían experimentaban un mayor índice de fracaso en su desarrollo postimplantacional, traducido en una mayor incidencia de reabsorciones y una menor cantidad de fetos vivos. Esta circunstancia plantea la posibilidad de que fenómenos de degeneración celular en las células oviductales durante el transporte liberen factores tóxicos al medio que comprometen de forma clara la viabilidad embrionaria (Gurgan et al., 1996; Miao et al., 2007) y que por tanto desaconsejarían la utilización de este abordaje.

Con todo lo descrito, este trabajo es uno de los pocos que demuestra las posibilidades, desde un punto de vista científico del transporte de embriones en condiciones de no congelación aportando una serie de recomendaciones novedosas. Desde el punto de vista práctico es más aconsejable la utilización de las bajas temperaturas con el fin de obtener las máximas eficiencias. No se descarta la utilización de la temperatura de 37°C pues con ella se han descrito buenas tasas de implantación, sin embargo hay una complicación técnica en el momento de la transferencia, ya que ésta se complica por el mayor volumen de los embriones mantenidos a esta temperatura ya que en la mayoría de los casos se habían desarrollado a blastocistos en el propio transporte. No es recomendable la utilización de la temperatura de 15°C pues como se ha demostrado a esta temperatura, algunos de los genes más importantes implicados en el desarrollo del embrión quedan completamente desregulados a esta temperatura, impidiendo el correcto desarrollo del embrión y su posterior implantación. Por último, nuestros resultados indican que aunque no es recomendable ni hacer un cultivo previo de los embriones antes del transporte, ni tampoco transportarlos en el interior de los oviductos. Si no hay alternativa, ambas modalidades permiten un desarrollo posterior suficiente como para permitir el intercambio de la estirpe entre instalaciones, aunque en este caso se requiere un número mayor de transferencias.

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Gracias a la utilización de modelos animales, el conocimiento humano y la ciencia han avanzado. Sin el desinteresado aporte de estos “compañeros” de trabajo, gran parte del camino recorrido hubiera sido imposible. Su utilización requiere de un uso racional que puede optimizarse perfeccionando técnicas o estableciendo nuevas formas de manejo que permitan obtener resultados con solidez científica sin hacer un uso injustificado de los mismos.

Este trabajo ha tenido por objeto, entre otras metas, la evaluación de nuevas técnicas que permitan abundar, por una parte, en el conocimiento acerca del espermatozoide murino tanto en un entorno natural tras su deposición en el aparato reproductor femenino como en procedimientos propios de laboratorio como la congelación-descongelación espermática o la inseminación artificial. Por otro lado, también hemos propuesto una alternativa al intercambio de animales vivos entre laboratorios, evitando someterlos a situaciones de estrés y el riesgo de la liberación involuntaria de animales modificados genéticamente, reduciendo además los costes que conlleva el transporte de animales vivos. A través de estos estudios hemos pretendido abrir la puerta a nuevas formas de entender la biología y biotecnología reproductiva del ratón, haciendo más sencillo, menos costoso y más racional el manejo de estos roedores en los animalarios.

En el primer trabajo presentado se realizó un análisis del comportamiento de los espermatozoides en el tracto uterino en condiciones de estro tardío tras la copula con el macho. Nuestra hipótesis de partida era que el tracto uterino es capaz de realizar una selección de los espermatozoides y que en esa selección podría jugar un papel importante la integridad del ADN que portan. Para evaluarlo, se utilizaron 2 modelos diferentes en los que se ocasionaron diferentes tipos de daño, estrés térmico escrotal y radiación ionizante. Estas fuentes de daño afectan diferencialmente a los tipos celulares presentes en el testículo. Así, mientras que el calor escrotal afectó a espermatocitos tardíos, la radiación ionizante ejerció el daño sobre espermatogonias. El daño ocasionado, además, es distinto; por una parte el calor escrotal origina un aumento de la fragmentación del ADN (Banks et al., 2005; Paul et al., 2008a; Perez-Crespo et al., 2008b) mientras que la radiación ionizante, además, modifica el código genético al introducir mutaciones en las bases que lo componen (Baulch and Raabe, 2005; Burrue et al., 1997; Hennig et al., 1996). Con estos modelos, se genera una situación en la que los espermatozoides eyaculados, poblacionalmente, presentan diferentes intensidades de daño, manteniéndose funcionales. En función de la fuente de daño se comprobó que tanto los espermatozoides procedentes de machos estresados térmicamente y radiados llegaban al sitio de fecundación con un valor bajo de fragmentación del ADN espermático. Sin embargo, se comprobó un aumento de las reabsorciones en el caso de los animales sometidos a la radiación ionizante. Este hecho demuestra que aún seleccionándose los espermatozoides con mejor integridad de ADN en términos de fragmentación, existe otro tipo de daño que es portado por este grupo de espermatozoides que el tracto reproductor femenino es incapaz de seleccionar. En el caso del modelo de estrés, el bajo número de fetos obtenidos se debe

posiblemente al número excepcionalmente bajo de espermatozoides que logran llegar a la zona de fecundación. Si se efectúa una fecundación *in vitro*, donde no hay selección previa de espermatozoides durante el ascenso de tracto genital, nuestro estudio evidenció que se anclan a la zona pelúcida espermatozoides tanto con alta como con baja integridad de ADN. Por tanto la zona pelúcida ejerce una nueva selección a favor de espermatozoides con ADN integro, ya que prácticamente la totalidad de los embriones producidos eran capaces de llegar a término y de ahí el insignificante número de reabsorciones observado. Nuestros resultados ponen de manifiesto que en este tipo de daño es necesario un efecto sinérgico con el tracto reproductivo para que la selección espermática sea completa.

Todo este estudio abre una puerta para establecer nuevos protocolos de actuación cuando son utilizados espermatozoides en técnicas de reproducción asistida. En concreto, cuando las barreras de selección natural son eludidas. Al comprobarse que la motilidad es el parámetro que se correlaciona con la fertilidad (Bronson et al., 2007; Derijck et al., 2007; Gomendio and Roldan, 2008), sería de obligada utilización aquellos espermatozoides con alta motilidad cuando se realiza la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), minimizando los riesgos de pérdidas embrionarias o de inducir alteraciones que podrían manifestarse en la vida postnatal.

El estudio de los fenómenos fisiológicos, además de permitir su caracterización también supone una fuente importante de conocimiento en la que fundamentar aplicaciones prácticas. Un ejemplo de esta situación se dio con el estudio de selección espermática que fue utilizado para intentar resolver un problema presente en los animalarios y laboratorios donde se trabaja con líneas transgénicas o mutantes.

La dificultad que existe a la hora de congelar el espermatozoide de la estirpe C57Bl/6 ha motivado una evolución de los protocolos de criopreservación. Sin embargo, existe un número elevado de dosis ya congeladas en condiciones subóptimas que hace que sea necesario mejorar los protocolos de descongelación, y al recuperar las líneas mediante las técnicas de reproducción asistida. En este sentido, y puesto que se ha comprobado que la selección espermática es un fenómeno que sucede *in vivo*, se pensó en utilizar el propio oviducto como mecanismo natural de selección para potenciar la capacidad fecundante de las dosis congeladas por sistemas tradicionales de criopreservación. En este trabajo se comparó la eficiencia de los métodos más habituales de congelación de espermatozoides de ratón, utilizándose para ello dos de las estirpes típicas en la generación de transgénicos: C57Bl/6 como fondo genético en la que se mantienen mayoritariamente las líneas transgénicas y B6CBAF1, una de las estirpes híbridas típicas donde se generan y representativa del denominado vigor híbrido en cuanto a características reproductivas. Así, se demostró que la congelación afecta a parámetros como la motilidad e integridad de membrana en mayor o menor grado en función de la estirpe.

El daño provocado por los procesos físicos que tienen lugar durante la congelación-descongelación de la muestra, sin embargo, no se correlacionan con la capacidad fecundante, indicando la necesidad de desarrollar otro tipo de estudios que complementen los parámetros utilizados normalmente en la batería de contrastación típica. En este trabajo, se comprobó que tanto los espermatozoides de la estirpe B6CBAF1 como la C57Bl/6, sufrieron un descenso de su motilidad e integridad de membrana y aún siendo significativamente diferentes, estas diferencias apenas suponían una diferencia del 10-15% entre estirpes. Sin embargo, al realizar la técnica de fecundación *in vitro*, se demostró que la capacidad fecundante de la estirpe híbrida se mantenía prácticamente intacta mientras que la de la estirpe C57Bl/6, apenas llegaba al 5-7%. Esta circunstancia supone una cuestión importante ya que evidencia la persistencia de una sub-población espermática cuya capacidad fecundante se mantiene o al menos, presenta la posibilidad de desarrollarla cuando se dan las condiciones óptimas. Diferentes autores han demostrado que el principal problema de los espermatozoides de la estirpe C57Bl/6 es la imposibilidad de sufrir el proceso de capacitación, tras la congelación (Takeo et al., 2008). De ahí que el uso de determinadas sustancias, iniciadoras de los fenómenos de capacitación a través de la movilización del colesterol en la membrana espermática (Choi and Toyoda, 1998; Liu et al., 2009; Movassaghi et al., 2009; Takeo and Nakagata), hayan supuesto una importante vía de actuación y permitan la recuperación de líneas transgénicas y mutantes congeladas en este fondo genético. Nuestra aportación pretendió ir más allá. En primer lugar quisimos caracterizar las sub-poblaciones desde el punto de vista de la fragmentación del ADN. Al igual que en el primer trabajo presentado, la correlación entre fragmentación del ADN y la fertilidad estaba estrechamente relacionada a través de la motilidad; de ahí que poblaciones de espermatozoides motiles, portadores de un ADN integro pudiesen tener preferencia a la hora de llegar al oviducto y fecundar. De forma similar, comprobamos que durante la congelación de espermatozoides se produce daño a nivel nuclear y que, para evaluar este daño es necesario seleccionar muy bien el tipo de análisis de fragmentación de ADN que se ha de realizar. Comprobamos mediante la técnica de TUNEL que el porcentaje de espermatozoides afectados para la situación control apenas se trataba de un 5% mientras que en los tratamientos no sobrepasaba el 16-20%. La técnica permite evaluar fragmentación tanto en hebra simple como doble, pero dado el protocolo aplicado estas alteraciones se encontrarían en unas regiones denominadas lazos, obviándose regiones más intimas del core nuclear. Por este motivo se empleó la segunda técnica SCGE o COMET. Mediante este protocolo y dado los procesos químicos que tienen lugar durante el procedimiento, se permite el análisis de todo el contenido nuclear. El porcentaje de espermatozoides dañados cambia con respecto a la técnica anterior, dando una información más real de la situación, en donde se comprueba que puede existir daño en determinadas regiones pero no suponen una modificación en la capacidad fecundante del espermatozoide. Al comprobar estos hechos y admitiendo la hipótesis de la existencia de sub-poblaciones espermáticas óptimas para la fecundación después de la congelación, se propuso como forma alternativa para la recuperación de líneas transgénicas la utilización de la inseminación artificial

intraoviductal con espermatozoides congelados. Esta técnica, permitiría por una parte facilitar el acceso de los espermatozoides a regiones próximas donde tiene lugar la fecundación pero lo suficientemente alejadas de ellas para que pudiese darse una selección espermática similar a la que se produce de forma natural. No se creyó conveniente realizar una inseminación intrauterina profunda, pues la concentración espermática de las dosis no lo permitiría al ser insuficiente. Las inseminaciones dieron como resultado un aumento de la tasa de fecundación con espermatozoides congelados de C57Bl/6 llegando hasta el 20%, mejorando los resultados obtenidos con FIV. Sin embargo, los porcentajes obtenidos con espermatozoides frescos (>50%) demostraron que las condiciones no eran las adecuadas pues se alejan de los valores que se obtienen mediante monta natural (>90%). Por tanto, aunque el número de espermatozoides sea suficiente y el tracto femenino pueda seleccionar a los que presentan mejores características, nunca se puede predecir qué tipo de espermatozoide va a fecundar ni qué tipo de daño va a portar. Aún pudiéndose haber seleccionado los espermatozoides óptimos para la fecundación por su mejor motilidad y por tanto con mayor integridad de ADN, estos pueden presentar otro tipo de alteraciones como la imposibilidad de sufrir la capacitación. Dado que la capacitación es un proceso que se inicia con la deposición del espermatozoide en la vagina (Abney and Williams, 1970; Fleming and Kuehl, 1985; Piehler et al., 2006; Troedsson et al., 1998), el tránsito a su través ocasiona una serie de modificaciones moleculares que facilitan su transporte (Han et al., 2007; Tulsiani, 2006) y adquisición de las competencias funcionales para las que está llamado (Dacheux and Paquignon, 1980). Por tanto, acortar el proceso natural realizando una inseminación intraoviductal no resuelve el problema de la fertilidad de los espermatozoides congelados de la estirpe C57Bl/6.

Además de la problemática de la recuperación de las líneas transgénicas en estirpe C57Bl/6 a través de los espermatozoides congelados, otro de los problemas que se plantean los grupos de investigación y los animalarios es el intercambio de líneas transgénicas y/o mutantes de ratones. Mientras que los procedimientos habituales pasarían por la congelación de los embriones y su transporte en tanques secos de nitrógeno, nosotros proponemos una nueva alternativa. En este trabajo planteamos la posibilidad de almacenar y/o transportar durante cortos periodos de tiempo (24-48 h) embriones de ratón en estadio de mórula. Con esto se abre una posibilidad técnica importante. La utilización de medios tamponados con hepes o simplemente equilibrados 24 h antes, supone una ventaja y un abaratamiento de los costes. Sin embargo, cuando son necesarios tiempos mayores para llevar a destino los embriones, la situación cambia. En esos casos, la temperatura de elección es 4°C, aun existiendo la posibilidad de utilizar tanto medios tamponados como únicamente equilibrados. Cuando los operadores no tienen destreza en la obtención y manipulación de embriones, existen pocas alternativas. Nosotros propusimos desde el punto de vista técnico, algunas de ellas. El cultivo *in vitro* de embriones desde el estadio de cigoto permite un aislamiento sencillo de éstos; las mórulas desarrolladas mediante este procedimiento se pueden transportar y/o almacenar durante 24 h. Su viabilidad pasado ese tiempo creemos que puede ser insuficiente para poder llevar a cabo periodos mayores de transporte. Al existir a las 24 h un descenso muy

significativo de la capacidad de implantación a 15°C, se recomienda la utilización de la temperatura de 4°C en cualquiera de los medios empleados. Otra posibilidad es la de transportar y/o almacenar embriones en sus oviductos. En este caso, y dado que la temperatura que mejor resultado dio en todos los casos fue la de 4°C, se decidió analizar únicamente esta temperatura y sólo un medio, KSOM-Hepes. Se observó que aunque la viabilidad en cultivo hasta estadio de blastocisto fue óptima (casi 100% de desarrollo), tras llevar a cabo la transferencia de los embriones a las hembras pseudogestantes, se comprobó un descenso drástico en la capacidad implantacional de los mismos. Por tanto, aun siendo posible técnicamente esta aproximación, su utilización queda restringida a su utilización como último recurso. Para esos casos, se necesitan un número lo suficientemente elevado de animales para que se pueda llevar a cabo la superovulación y recogida de los oviductos y se asegure la continuidad de la colonia.

A lo largo de toda esta tesis Doctoral se ha puesto de manifiesto que el conocimiento sobre cuestiones básicas en ciencia puede dar lugar a aplicaciones y/o protocolos técnicos. Así, el manejo reproductivo del ratón permite, por una parte, gestionar de forma más eficiente la colonia de animales y, por otra, facilitar las colaboraciones científicas entre distintos grupos de investigación.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- La motilidad espermática es un parámetro esencial para que los fenómenos de selección tengan lugar durante el tránsito del espermatozoide a través del tracto reproductor femenino.
- 2.- Existe una estrecha correlación negativa entre motilidad y fragmentación de ADN espermático. Los espermatozoides con alta motilidad son los que portan ADN menos dañado y llegan preferentemente al sitio de fecundación. Sin embargo, ciertos tipos de daño en el ADN espermático (modificaciones de bases o mutaciones) no se ajustan a esta correlación, por lo que no pueden ser seleccionados negativamente por el tracto reproductor materno.
- 3.- Los mecanismos naturales de selección, son capaces de discriminar en gran medida la calidad de los espermatozoides. Entendiendo las bases que los rigen podrán establecerse pruebas de fertilidad, rigurosas y fiables, de obligada necesidad cuando los espermatozoides van a ser utilizados en técnicas de reproducción asistida que sobrepasan las barreras naturales de selección, como es en el caso de ICSI.
- 4.- La fragmentación del ADN espermático es un proceso que, en mayor o menor medida, es inherente a la conservación de espermatozoides mediante criopreservación. El grado de daño es dependiente de la estirpe. En el caso de la estirpe C57Bl/6, la fragmentación del ADN espermático, sin embargo, no es la causa de la baja tasa de fecundación mediante fecundación *in vitro*.
- 5.- La utilización de mezclas crioprotectoras no penetrantes hace más eficiente la congelación de espermatozoides de ratón.
- 6.- En la búsqueda de nuevas técnicas que permitan la recuperación de líneas mediante la utilización de espermatozoides de ratón criopreservados en condiciones subóptimas, la inseminación artificial intraoviductal permite una mejora en las tasas de fecundación en comparación con las obtenidas mediante fecundación *in vitro*; sin embargo, el nivel de mejora y la complejidad de la técnica no justifican su uso rutinario.
- 7.- El transporte en fresco de embriones obtenidos en estadio de mórula es una alternativa válida a la utilización de embriones congelados. Es posible transportar/almacenar embriones desarrollados *in vivo* de ratón en estadio de mórula durante 24 h a diferentes temperaturas (4°C, 15°C o 37°C) y en diferentes medios (KSOM y KSOM-Hepes) sin detrimento en su viabilidad post-implantacional. Para periodos más largos, sin embargo la temperatura de 4°C asegura una mejor viabilidad y facilita técnicamente la transferencia.
- 8.- En aquellas circunstancias en que para el transporte en fresco no se cuenta con medios para hacer una recogida de embriones a partir del lavado del oviducto, es posible recurrir al

CONCLUSIONES

transporte de embriones cultivados *in vitro*. En este caso se debe utilizar una temperatura baja (4°C) y cortos periodos de tiempo (24 h). El transporte o almacenamiento de embriones dentro de los propios oviductos, sólo debe utilizarse en aquellos casos en los que no hay ninguna otra alternativa ya que descienden drásticamente las tasas de implantación.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Sperm motility is the essential parameter for the selection mechanisms during female genital tract migration to take place.
2. A close negative correlation exists between motility and DNA fragmentation. Highly motile sperm cells carry the less damaged DNA and they reach preferentially the site of fertilization. However, certain types of sperm DNA damage (bases modification or mutations) are not correlated with classic sperm parameters, consequently, these sperm can not be negatively selected by the female reproductive tract
3. Sperm selection mechanisms that occur in nature (or in the female reproductive tract) are able to select high quality spermatozoa. The knowledge of the basis of these mechanisms give us important information to improve techniques of sperm selection previous to the performance of ART techniques such as ICSI, that overpass natural selection barriers,
4. Sperm DNA fragmentation is linked to a certain extent to sperm cryopreservation. The intensity of the damage depends on the strain. In the case of C57Bl/6 strain, however, we can not attribute the low fertility rate after IVF with frozen-thawed spermatozoa to DNA fragmentation
5. Non-penetrant cryoprotectant mixtures increase efficiency of mouse sperm cryopreservation.
6. In the search of new techniques to recover archived mice lines as cryopreserved spermatozoa in suboptimal conditions, intraoviductal transfer of spermatozoa (IOTS) improves the fertility rates compared to the results obtained after IVF; but the degree of improvement and the technical difficulty of its performance do not justify the routinely use of IOTS .
7. Transport/Storage of fresh morula stage embryos is a valid alternative to cryopreserved embryos. It is possible to ship/store *in vivo* developed mice morulae for 24 hours at different temperatures (4°C, 15°C or 37°C) or in different media (KSOM and KSOM-hepes) without altering their post-implantational viability. The shipment of these embryos can also be carried out for 48 hours, but in this case the temperature of choice for the shipment is 4°C.because it provides better viability and it technically facilitates embryo transfer

CONCLUSIONS

8. In such circumstances where it is not possible to perform oviduct flushing to collect *in vivo* produced embryos, it is possible to ship *in vitro* cultured morulae. In this case, low temperatures (4°C) and short periods of shipment (24h) are recommended. Embryo shipment within the oviducts should only be used as a last resource since implantation rates in such conditions are severely compromised.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

- Abas Mazni, O., Y. Takahashi, C.A. Valdez, M. Hishinuma, and H. Kanagawa. 1989. Effects of various cryoprotectants on the survival of mouse embryos cryopreserved by the quick freezing method. *Jpn J Vet Res.* 37:29-39.
- Abney, T.O., and W.L. Williams. 1970. Inhibition of sperm capacitation by intrauterine deposition of seminal plasma decapacitation factor. *Biol Reprod.* 2:14-7.
- Agarwal, A., and T.M. Said. 2003. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update.* 9:331-45.
- Agarwal, A., R.A. Saleh, and M.A. Bedaiwy. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.* 79:829-43.
- Ahmad, L., S. Jalali, S.A. Shami, Z. Akram, S. Batool, and O. Kalsoom. Effects of cryopreservation on sperm DNA integrity in normospermic and four categories of infertile males. *Syst Biol Reprod Med.* 56:74-83.
- Ahmadi, A., and S.C. Ng. 1999a. Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum Reprod.* 14:2279-85.
- Ahmadi, A., and S.C. Ng. 1999b. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool.* 284:696-704.
- Aitken, R.J. 1999. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis? *J Reprod Fertil.* 115:1-7.
- Aitken, R.J., and M.A. Baker. 2004. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil Dev.* 16:581-8.
- Aitken, R.J., E. Gordon, D. Harkiss, J.P. Twigg, P. Milne, Z. Jennings, and D.S. Irvine. 1998. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 59:1037-46.
- Aitken, R.J., and C. Krausz. 2001. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction.* 122:497-506.
- Aitken, R.J., N.E. Skakkebaek, and S.D. Roman. 2006. Male reproductive health and the environment. *Med J Aust.* 185:414-5.
- Alghamdi, A.S., and D.N. Foster. 2005. Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. *Biol Reprod.* 73:1174-81.
- Amann, R.P., and R.H. Hammerstedt. 2002. Advisory counsel survey and the role of IUI. *Fertil Steril.* 78:651-2; author reply 652.
- Anderson, G.B., and R.H. Foote. 1975a. Development of rabbit embryos after storage at 10 C-1. *J Anim Sci.* 40:900-4.

- Anderson, G.B., and R.H. Foote. 1975b. Development of rabbit embryos in vitro and in vivo following storage of the two-cell stage at 10 degrees C. *J Reprod Fertil.* 45:151-3.
- Andolz, P., M.A. Bielsa, A. Genesca, J. Benet, and J. Egozcue. 1987. Improvement of sperm quality in abnormal semen samples using a modified swim-up procedure. *Hum Reprod.* 2:99-101.
- Aoki, V.W., A.L. Wilcox, C.M. Peterson, K. Parker-Jones, H.H. Hatasaka, M. Gibson, I. Huang, and D.T. Carrell. 2005. Comparison of four media types during 3-day human IVF embryo culture. *Reprod Biomed Online.* 10:600-6.
- Aubard, Y. 2003. Ovarian tissue xenografting. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 108:14-8.
- Bagis, H., and H. Odaman Mercan. 2004. Effect of chemically defined culture medium supplemented with beta-mercaptoethanol and amino acids on implantation and development of different stage in vivo- or in vitro-derived mouse embryos. *Mol Reprod Dev.* 69:52-9.
- Baker, M.A., and R.J. Aitken. 2005. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 3:67.
- Baltz, J.M., and A.P. Tartia. Cell volume regulation in oocytes and early embryos: connecting physiology to successful culture media. *Hum Reprod Update.* 16:166-76.
- Banks, S., S.A. King, D.S. Irvine, and P.T. Saunders. 2005. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction.* 129:505-14.
- Bansal, A.K., and G.S. Bilaspuri. 2008. Oxidative stress alters membrane sulfhydryl status, lipid and phospholipid contents of crossbred cattle bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 104:398-404.
- Barbas, J.P., and R.D. Mascarenhas. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank.* 10:49-62.
- Barratt, C.L., R.J. Aitken, L. Bjorndahl, D.T. Carrell, P. de Boer, U. Kvist, S.E. Lewis, S.D. Perreault, M.J. Perry, L. Ramos, B. Robaire, S. Ward, and A. Zini. Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications--a position report. *Hum Reprod.* 25:824-38.
- Barroso, G., M. Morshedi, and S. Oehninger. 2000. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 15:1338-44.
- Bartek, J., C. Lukas, and J. Lukas. 2004. Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:792-804.
- Bartek, J., and J. Lukas. 2007. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol.* 19:238-45.
- Bath, M.L. 2003. Simple and efficient in vitro fertilization with cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. *Biol Reprod.* 68:19-23.

- Baulch, J.E., M.W. Li, and O.G. Raabe. 2007. Effect of ATM heterozygosity on heritable DNA damage in mice following paternal F0 germline irradiation. *Mutat Res.* 616:34-45.
- Baulch, J.E., and O.G. Raabe. 2005. Gamma irradiation of Type B spermatogonia leads to heritable genomic instability in four generations of mice. *Mutagenesis.* 20:337-43.
- Baumber, J., B.A. Ball, and J.J. Linfor. 2005. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *Am J Vet Res.* 66:772-9.
- Bedford, J.M. 1998. Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biol Reprod.* 59:1275-87.
- Behr, B.R., C.J. Stratton, W.D. Foote, V. Knutzen, and G. Sher. 1990. In vitro fertilization (IVF) of mouse ova in HEPES-buffered culture media. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 7:9-15.
- Bellve, A.R., J.C. Cavicchia, C.F. Millette, D.A. O'Brien, Y.M. Bhatnagar, and M. Dym. 1977. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol.* 74:68-85.
- Benchabib, M., V. Braun, J. Lornage, S. Hadj, B. Salle, H. Lejeune, and J.F. Guerin. 2003. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod.* 18:1023-8.
- Bennetts, L.E., and R.J. Aitken. 2005. A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 71:77-87.
- Berghuis, G.A. 1987. [Sperm received in shipment versus fresh sperm in relation to fertilization results]. *Tijdschr Diergeneeskd.* 112:1410-2.
- Berlinguer, F., M. Madeddu, V. Pasciu, S. Succu, A. Spezzigu, V. Satta, P. Mereu, G.G. Leoni, and S. Naitana. 2009. Semen molecular and cellular features: these parameters can reliably predict subsequent ART outcome in a goat model. *Reprod Biol Endocrinol.* 7:125.
- Berry, M.D., and A.A. Boulton. 2000. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and apoptosis. *J Neurosci Res.* 60:150-4.
- Bielanski, A., H. Bergeron, P.C. Lau, and J. Devenish. 2003. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology.* 46:146-52.
- Bjorndahl, L., and U. Kvist. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Mol Hum Reprod.* 16:23-9.
- Boaz, S.M., K. Dominguez, J.A. Shaman, and W.S. Ward. 2008. Mouse spermatozoa contain a nuclease that is activated by pretreatment with EGTA and subsequent calcium incubation. *J Cell Biochem.* 103:1636-45.
- Boe-Hansen, G.B., P. Christensen, D. Vibjerg, M.B. Nielsen, and A.M. Hedeboe. 2008. Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. *Theriogenology.* 69:728-36.

- Boe-Hansen, G.B., A.K. Ersboll, T. Greve, and P. Christensen. 2005. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology*. 63:2006-19.
- Bollwein, H., I. Fuchs, and C. Koess. 2008. Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Reprod Domest Anim*. 43:189-95.
- Bondurant, R.H., C.B. Anderson, M.P. Boland, P.T. Cupps, and M.A. Hughes. 1982. Preliminary studies on bovine embryo survival following short-term storage at 4 degrees C. *Theriogenology*. 17:223-30.
- Borini, A., N. Tarozzi, D. Bizzaro, M.A. Bonu, L. Fava, C. Flamigni, and G. Coticchio. 2006. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod*. 21:2876-81.
- Braun, R.E. 1998. Post-transcriptional control of gene expression during spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 9:483-9.
- Bronson, R.A., S.K. Bronson, and L.D. Oula. 2007. Ability of abnormally-shaped human spermatozoa to adhere to and penetrate zona-free hamster eggs: correlation with sperm morphology and postincubation motility. *J Androl*. 28:698-705.
- Brum, A.M., K. Sabeur, and B.A. Ball. 2008. Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation. *Theriogenology*. 69:1041-55.
- Bryksin, A.V., and P.P. Laktionov. 2008. Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in vesicular transport from golgi apparatus to endoplasmic reticulum. *Biochemistry (Mosc)*. 73:619-25.
- Bungum, M., P. Humaidan, M. Spano, K. Jepson, L. Bungum, and A. Giwercman. 2004. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod*. 19:1401-8.
- Burrue, V.R., O.G. Raabe, and L.M. Wiley. 1997. In vitro fertilization rate of mouse oocytes with spermatozoa from the F1 offspring of males irradiated with 1.0 Gy ¹³⁷Cs gamma-rays. *Mutat Res*. 381:59-66.
- Bussalleu, E., E. Pinart, M. Yeste, M. Briz, S. Sancho, N. Garcia-Gil, E. Badia, J. Bassols, A. Pruneda, I. Casas, and S. Bonet. 2005. Development of a protocol for multiple staining with fluorochromes to assess the functional status of boar spermatozoa. *Microsc Res Tech*. 68:277-83.
- Callegari, A.J., and T.J. Kelly. 2007. Shedding light on the DNA damage checkpoint. *Cell Cycle*. 6:660-6.
- Carney, N.J., E.L. Squires, V.M. Cook, G.E. Seidel, Jr., and D.J. Jasko. 1991. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. *Theriogenology*. 36:23-32.
- Carrell, D.T., L. Liu, C.M. Peterson, K.P. Jones, H.H. Hatasaka, L. Erickson, and B. Campbell. 2003a. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl*. 49:49-55.

- Carrell, D.T., A.L. Wilcox, L. Lowy, C.M. Peterson, K.P. Jones, L. Erickson, B. Campbell, D.W. Branch, and H.H. Hatasaka. 2003b. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol.* 101:1229-35.
- Cordelli, E., A.M. Fresegna, G. Leter, P. Eleuteri, M. Spano, and P. Villani. 2003. Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation. *Radiat Res.* 160:443-51.
- Critser, J.K., and L.E. Mobraaten. 2000. Cryopreservation of murine spermatozoa. *ILAR J.* 41:197-206.
- Cummins, J.M., T. Wakayama, and R. Yanagimachi. 1997. Fate of microinjected sperm components in the mouse oocyte and embryo. *Zygote.* 5:301-8.
- Chang, M.C. 1948. The effects of low temperature on fertilized rabbit ova in vitro, and the normal development of ova kept at low temperature for several days. *J Gen Physiol.* 31:385-410.
- Cheng, E.H., W. Chen, S.Y. Chang, J.J. Huang, C.C. Huang, L.S. Huang, C.H. Liu, and M.S. Lee. 2008. Blastocoel volume is related to successful establishment of human embryonic stem cell lines. *Reprod Biomed Online.* 17:436-44.
- Cho, C., D.O. Bunch, J.E. Faure, E.H. Goulding, E.M. Eddy, P. Primakoff, and D.G. Myles. 1998. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science.* 281:1857-9.
- Choi, Y.H., and Y. Toyoda. 1998. Cyclodextrin removes cholesterol from mouse sperm and induces capacitation in a protein-free medium. *Biol Reprod.* 59:1328-33.
- Chupin, D., and M.M. De Reviers. 1986. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology.* 26:157-66.
- Dacheux, J.L., and M. Paquignon. 1980. Relations between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa. *Reprod Nutr Dev.* 20:1085-99.
- Darin-Bennett, A., and I.G. White. 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology.* 14:466-70.
- Davis, D.L. 1985. Culture and storage of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl.* 33:115-24.
- De Vita, R., A. Calugi, C. Chiarantano, D. Forte, F. Mauro, and R. Uccelli. 1990. Effects of heat on mouse spermatogenesis monitored by flow cytometry. *Int J Hyperthermia.* 6:543-51.
- DeJarnette, J.M., R.G. Saacke, J. Bame, and C.J. Vogler. 1992. Accessory sperm: their importance to fertility and embryo quality, and attempts to alter their numbers in artificially inseminated cattle. *J Anim Sci.* 70:484-91.
- Depa-Martynow, M., P. Jedrzejczak, and L. Pawelczyk. 2007. Pronuclear scoring as a predictor of embryo quality in in vitro fertilization program. *Folia Histochem Cytobiol.* 45 Suppl 1:S85-9.

- Derijck, A.A., G.W. van der Heijden, L. Ramos, M. Giele, J.A. Kremer, and P. de Boer. 2007. Motile human normozoospermic and oligozoospermic semen samples show a difference in double-strand DNA break incidence. *Hum Reprod.* 22:2368-76.
- Devireddy, R.V., D.J. Swanlund, K.P. Roberts, and J.C. Bischof. 1999. Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice and cryoprotective agents. *Biol Reprod.* 61:764-75.
- Dinnyes, A., G.A. Wallace, and W.F. Rall. 1995. Effect of genotype on the efficiency of mouse embryo cryopreservation by vitrification or slow freezing methods. *Mol Reprod Dev.* 40:429-35.
- Dobrinski, I., S.S. Suarez, and B.A. Ball. 1996. Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa attached to oviductal epithelial cells in vitro. *Biol Reprod.* 54:783-8.
- Dobrinsky, J.R. 1997. Cryopreservation of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl.* 52:301-12.
- Dobrowolski, R., G. Hertig, H. Lechner, P. Worsdorfer, V. Wulf, N. Dicke, D. Eckert, R. Bauer, H. Schorle, and K. Willecke. 2009. Loss of connexin43-mediated gap junctional coupling in the mesenchyme of limb buds leads to altered expression of morphogens in mice. *Hum Mol Genet.* 18:2899-911.
- Dong, Q., D. Hill, and C.A. VandeVoort. 2009. Interactions among pre-cooling, cryoprotectant, cooling, and thawing for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. *Cryobiology.* 59:268-74.
- Donnelly, E.T., N. McClure, and S.E. Lewis. 2001. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril.* 76:892-900.
- Drobnis, E.Z., and J.W. Overstreet. 1992. Natural history of mammalian spermatozoa in the female reproductive tract. *Oxf Rev Reprod Biol.* 14:1-45.
- Du Mesnil du Buisson, F., and J.P. Signoret. 1970. Reproductive physiology and artificial insemination in pigs. *Vet Rec.* 87:562-8.
- Duran, E.H., M. Morshedi, S. Taylor, and S. Oehninger. 2002. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod.* 17:3122-8.
- Duselis, A.R., and P.B. Vrana. 2007. Harvesting sperm and artificial insemination of mice. *J Vis Exp*:184.
- Enciso, M., L. Muriel, J.L. Fernandez, V. Goyanes, E. Segrelles, M. Marcos, J.M. Montejo, M. Ardoy, A. Pacheco, and J. Gosálvez. 2006. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J Androl.* 27:106-11.
- Enkhmaa, D., T. Kasai, and K. Hoshi. 2008. Long-Time Exposure of Mouse Embryos to the Sperm Produces High Levels of Reactive Oxygen Species in Culture Medium and Relates to Poor Embryo Development. *Reprod Domest Anim.*

- Erbach, G.T., J.A. Lawitts, V.E. Papaioannou, and J.D. Biggers. 1994. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biol Reprod.* 50:1027-33.
- Estop, A., V. Catala, and J. Santalo. 1990. Chromosome constitution of highly motile mouse sperm. *Mol Reprod Dev.* 27:168-72.
- Evenson, D., and L. Jost. 2000. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci.* 22:169-89.
- Evenson, D.P. 1999. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reprod Fertil Dev.* 11:1-15.
- Evenson, D.P., Z. Darzynkiewicz, and M.R. Melamed. 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science.* 210:1131-3.
- Evenson, D.P., L.K. Jost, D. Marshall, M.J. Zinaman, E. Clegg, K. Purvis, P. de Angelis, and O.P. Claussen. 1999. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 14:1039-49.
- Evenson, D.P., K.L. Larson, and L.K. Jost. 2002. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl.* 23:25-43.
- Eyestone, W.H., M.L. Leibfried-Rutledge, D.L. Northey, B.G. Gilligan, and N.L. First. 1987. Culture of one- and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. *Theriogenology.* 28:1-7.
- Fahning, M.L., and M.A. Garcia. 1992. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology.* 29:1-18.
- Fan, Z.Q., Y.P. Wang, C.L. Yan, L. Suo, and S.E. Zhu. 2009. Positive effect of partial zona pellucida digestion on in vitro fertilization of mouse oocytes with cryopreserved spermatozoa. *Lab Anim.* 43:72-7.
- Fatehi, A.N., M.M. Bevers, E. Schoevers, B.A. Roelen, B. Colenbrander, and B.M. Gadella. 2006. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl.* 27:176-88.
- Fernandez-Gonzalez, R., J. de Dios Hourcade, I. Lopez-Vidriero, A. Benguria, F.R. De Fonseca, and A. Gutierrez-Adan. 2009. Analysis of gene transcription alterations at the blastocyst stage related to the long-term consequences of in vitro culture in mice. *Reproduction.* 137:271-83.
- Fernandez-Gonzalez, R., M.A. Ramirez, A. Bilbao, F.R. De Fonseca, and A. Gutierrez-Adan. 2007. Suboptimal in vitro culture conditions: an epigenetic origin of long-term health effects. *Mol Reprod Dev.* 74:1149-56.
- Fernandez, J.L., and J. Gosalvez. 2002. Application of FISH to detect DNA damage. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH). *Methods Mol Biol.* 203:203-16.

- Fernandez, J.L., L. Muriel, V. Goyanes, E. Segrelles, J. Gosálvez, M. Enciso, M. LaFromboise, and C. De Jonge. 2005a. Halosperm is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril*. 84:860.
- Fernandez, J.L., L. Muriel, V. Goyanes, E. Segrelles, J. Gosálvez, M. Enciso, M. LaFromboise, and C. De Jonge. 2005b. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*. 84:833-42.
- Fernandez, J.L., L. Muriel, M.T. Rivero, V. Goyanes, R. Vazquez, and J.G. Alvarez. 2003. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl*. 24:59-66.
- Fernandez, J.L., F. Vazquez-Gundin, A. Delgado, V.J. Goyanes, J. Ramiro-Díaz, J. de la Torre, and J. Gosálvez. 2000. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat Res*. 453:77-82.
- Fischer, M.A., J. Willis, and A. Zini. 2003. Human sperm DNA integrity: correlation with sperm cytoplasmic droplets. *Urology*. 61:207-11.
- Flaherty, S.P., D. Payne, N.J. Swann, and C.D. Matthews. 1995. Assessment of fertilization failure and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod Fertil Dev*. 7:197-210.
- Fleming, A.D., and T.J. Kuehl. 1985. Effects of temperature upon capacitation of guinea pig spermatozoa. *J Exp Zool*. 233:405-11.
- Flores, E., J.M. Fernandez-Novell, A. Pena, and J.E. Rodríguez-Gil. 2009. The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. *Theriogenology*. 72:784-97.
- Frankenberg-Schwager, M. 1990. Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eukaryotic cells. *Radiat Environ Biophys*. 29:273-92.
- Fraser, L. 2004. Structural damage to nuclear DNA in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and relationship with male infertility. *Pol J Vet Sci*. 7:311-21.
- Fraser, L., and J. Strzezek. 2004. The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 degrees C and 16 degrees C. *Folia Histochem Cytobiol*. 42:49-55.
- Fuller, S.J., and D.G. Whittingham. 1996. Effect of cooling mouse spermatozoa to 4 degrees C on fertilization and embryonic development. *J Reprod Fertil*. 108:139-45.
- Fuller, S.J., and D.G. Whittingham. 1997. Capacitation-like changes occur in mouse spermatozoa cooled to low temperatures. *Mol Reprod Dev*. 46:318-24.
- Gaczarzewicz, D., M. Piasecka, J. Udała, B. Blaszczyk, T. Stankiewicz, and M. Laszczynska. Plasma membrane changes during the liquid storage of boar spermatozoa: A comparison of methods. *Acta Vet Hung*. 58:105-16.

- Gaddum-Rosse, P. 1981. Some observations on sperm transport through the uterotubal junction of the rat. *Am J Anat.* 160:333-41.
- Gaddum-Rosse, P. 1985. Mammalian gamete interactions: what can be gained from observations on living eggs? *Am J Anat.* 174:347-56.
- Gandini, G., F. Pizzi, A. Stella, and P.J. Boettcher. 2007. The costs of breed reconstruction from cryopreserved material in mammalian livestock species. *Genet Sel Evol.* 39:465-79.
- Gandini, L., F. Lombardo, A. Lenzi, M. Spano, and F. Dondero. 2006. Cryopreservation and sperm DNA integrity. *Cell Tissue Bank.* 7:91-8.
- Gantchev, T.G., S. Girouard, D.W. Dodd, F. Wojciechowski, R.H. Hudson, and D.J. Hunting. 2009. Gamma-radiation induced interstrand cross-links in PNA:DNA heteroduplexes. *Biochemistry.* 48:7032-44.
- Gao, D., and J.K. Critser. 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J.* 41:187-96.
- Gao, D.Y., E. Ashworth, P.F. Watson, F.W. Kleinhans, P. Mazur, and J.K. Critser. 1993. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biol Reprod.* 49:112-23.
- Garcia-Vazquez, F.A., E. Garcia-Rosello, A. Gutierrez-Adan, and J. Gadea. 2009. Effect of sperm treatment on efficiency of EGFP-expressing porcine embryos produced by ICSI-SMGT. *Theriogenology.* 72:506-18.
- Garrick, D., S. Fiering, D.I. Martin, and E. Whitelaw. 1998. Repeat-induced gene silencing in mammals. *Nat Genet.* 18:56-9.
- Gasinska, A., and S. Hill. 1990. The effect of hyperthermia on the mouse testis. *Neoplasma.* 37:357-66.
- Genesca, A., M.R. Caballin, R. Miro, J. Benet, J.R. Germa, and J. Egozcue. 1992. Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Hum Genet.* 89:181-6.
- Giwerzman, A., J. Richthoff, H. Hjollund, J.P. Bonde, K. Jepson, B. Frohm, and M. Spano. 2003. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertil Steril.* 80:1404-12.
- Gomendio, M., and E.R. Roldan. 2008. Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *Int J Dev Biol.* 52:439-47.
- Gopalkrishnan, K., K. Hurkadli, V. Padwal, and D. Balaiah. 1999. Use of acridine orange to evaluate chromatin integrity of human spermatozoa in different groups of infertile men. *Andrologia.* 31:277-82.
- Gorczyca, W., J. Gong, and Z. Darzynkiewicz. 1993. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res.* 53:1945-51.
- Gualtieri, R., and R. Talevi. 2000. In vitro-cultured bovine oviductal cells bind acrosome-intact sperm and retain this ability upon sperm release. *Biol Reprod.* 62:1754-62.

- Gudkov, S.V., I.N. Shtarkman, V.S. Smirnova, A.V. Chernikov, and V.I. Bruskov. 2006. Guanosine and inosine display antioxidant activity, protect DNA in vitro from oxidative damage induced by reactive oxygen species, and serve as radioprotectors in mice. *Radiat Res.* 165:538-45.
- Gurgan, T., B. Urman, and H. Yarali. 1996. Results of in vitro fertilization and embryo transfer in women with infertility due to genital tuberculosis. *Fertil Steril.* 65:367-70.
- Gutierrez, A., J. Garde, C.G. Artiga, I. Munoz, and B. Pintado. 1993. In vitro survival of murine morulae after quick freezing in the presence of chemically defined macromolecules and different cryoprotectants. *Theriogenology.* 39:1111-20.
- Hagaman, J.R., J.S. Moyer, E.S. Bachman, M. Sibony, P.L. Magyar, J.E. Welch, O. Smithies, J.H. Kregge, and D.A. O'Brien. 1998. Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:2552-7.
- Haines, G.A., J.H. Hendry, C.P. Daniel, and I.D. Morris. 2001. Increased levels of comet-detected spermatozoa DNA damage following in vivo isotopic- or X-irradiation of spermatogonia. *Mutat Res.* 495:21-32.
- Haines, G.A., J.H. Hendry, C.P. Daniel, and I.D. Morris. 2002. Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by the comet assay in murine spermatozoa after testicular X-irradiation. *Biol Reprod.* 67:854-61.
- Hamatani, T., T. Daikoku, H. Wang, H. Matsumoto, M.G. Carter, M.S. Ko, and S.K. Dey. 2004. Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:10326-31.
- Hammadeh, M.E., M. Radwan, S. Al-Hasani, R. Micu, P. Rosenbaum, M. Lorenz, and W. Schmidt. 2006. Comparison of reactive oxygen species concentration in seminal plasma and semen parameters in partners of pregnant and non-pregnant patients after IVF/ICSI. *Reprod Biomed Online.* 13:696-706.
- Hammadeh, M.E., T. Zeginiadov, P. Rosenbaum, T. Georg, W. Schmidt, and E. Strehler. 2001. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Arch Androl.* 46:99-104.
- Hammerstedt, R.H., J.K. Graham, and J.P. Nolan. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl.* 11:73-88.
- Han, Y., C.J. Haines, and H.L. Feng. 2007. Role(s) of the serine/threonine protein phosphatase 1 on mammalian sperm motility. *Arch Androl.* 53:169-77.
- Harper, M.J., and L.E. Rowson. 1963. Attempted Storage of Sheep Ova at 7 Degrees Centigrade. *J Reprod Fertil.* 6:183-91.
- Hawkins, R.B. 2005. The influence of concentration of DNA on the radiosensitivity of mammalian cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 63:529-35.
- Henkel, R., M. Hajimohammad, T. Stalf, C. Hoogendijk, C. Mehnert, R. Menkveld, H. Gips, W.B. Schill, and T.F. Kruger. 2004. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril.* 81:965-72.

- Hennig, U.G., Q. Wang, N.H. Gee, and R.C. von Borstel. 1996. Protection and repair of gamma-radiation-induced lesions in mice with DNA or deoxyribonucleoside treatments. *Mutat Res.* 350:247-54.
- Henriksen, K., J. Kulmala, J. Toppari, K. Mehrotra, and M. Parvinen. 1996. Stage-specific apoptosis in the rat seminiferous epithelium: quantification of irradiation effects. *J Androl.* 17:394-402.
- Herr, C.M., and R.W. Wright, Jr. 1988. Cold storage of mouse embryos of different stages of development. *Theriogenology.* 29:765-70.
- Ho, Y., K. Wigglesworth, J.J. Eppig, and R.M. Schultz. 1995. Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Mol Reprod Dev.* 41:232-8.
- Hogan, B., R. Beddington, F. Costantini, and E. Lacy. 1994. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Holt, W.V., and K.J. Van Look. 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction.* 127:527-35.
- Hollinshead, F.K., J.K. O'Brien, L. Gillan, M. Meyers, W.M. Maxwell, and G. Evans. 2004. Liquid storage of flow cytometrically sorted ram spermatozoa. *Theriogenology.* 62:587-605.
- Honadel, T.E., and G.J. Killian. 1988. Cryopreservation of murine embryos with trehalose and glycerol. *Cryobiology.* 25:331-7.
- Hoshi, K., H. Katayose, K. Yanagida, Y. Kimura, and A. Sato. 1996. The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil Steril.* 66:634-9.
- Host, E., S. Lindenberg, and S. Smidt-Jensen. 2000. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 79:559-63.
- Houdebine, L.M. 2000. Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Res.* 9:305-20.
- Hourcade, J.D., M. Perez-Crespo, R. Fernandez-Gonzalez, B. Pintado, and A. Gutierrez-Adan. Selection against spermatozoa with fragmented DNA after postovulatory mating depends on the type of damage. *Reprod Biol Endocrinol.* 8:9.
- Howell, S.J., and S.M. Shalet. 2005. Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 12-7.
- Hu, J.H., Q.W. Li, Z.L. Jiang, and W.Y. Li. 2008. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Cryobiology.* 57:257-62.
- Huang, C.C., D.P. Lin, H.M. Tsao, T.C. Cheng, C.H. Liu, and M.S. Lee. 2005. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril.* 84:130-40.

- Hud, N.V., M.J. Allen, K.H. Downing, J. Lee, and R. Balhorn. 1993. Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun.* 193:1347-54.
- Hud, N.V., F.P. Milanovich, and R. Balhorn. 1994. Evidence of novel secondary structure in DNA-bound protamine is revealed by Raman spectroscopy. *Biochemistry.* 33:7528-35.
- Hunter, R.H. 1984. Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *J Reprod Fertil.* 72:203-11.
- Hunter, R.H., and P.J. Dziuk. 1968. Sperm penetration of pig eggs in relation to the timing of ovulation and insemination. *J Reprod Fertil.* 15:199-208.
- Hunter, R.H., and R. Nichol. 1983. Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. *J Exp Zool.* 228:121-8.
- Hunter, R.H., and R. Nichol. 1988. Capacitation potential of the fallopian tube: a study involving surgical insemination and the subsequent incidence of polyspermy. *Gamete Res.* 21:255-66.
- Hunter, R.H., and I. Wilmut. 1984. Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod Nutr Dev.* 24:597-608.
- Hurley, P.J., and F. Bunz. 2007. ATM and ATR: components of an integrated circuit. *Cell Cycle.* 6:414-7.
- Irvine, D.S., J.P. Twigg, E.L. Gordon, N. Fulton, P.A. Milne, and R.J. Aitken. 2000. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl.* 21:33-44.
- Ivell, R. 2007. Lifestyle impact and the biology of the human scrotum. *Reprod Biol Endocrinol.* 5:15.
- Jannes, P., C. Spiessens, I. Van der Auwera, T. D'Hooghe, G. Verhoeven, and D. Vanderschueren. 1998. Male subfertility induced by acute scrotal heating affects embryo quality in normal female mice. *Hum Reprod.* 13:372-5.
- Janus, L.M., A. Smoczek, H.J. Hedrich, and A. Bleich. 2009. Risk assessment of minute virus of mice transmission during rederivation: detection in reproductive organs, gametes, and embryos of mice after in vivo infection. *Biol Reprod.* 81:1010-5.
- Januskauskas, A., K. Lukoseviciute, S. Nagy, A. Johannisson, and H. Rodriguez-Martinez. 2005. Assessment of the efficacy of Sephadex G-15 filtration of bovine spermatozoa for cryopreservation. *Theriogenology.* 63:160-78.
- Jeyendran, R.S., H.H. Van der Ven, W.P. Kennedy, E. Heath, M. Perez-Pelaez, A.J. Sobrero, and L.J. Zaneveld. 1985. Acrosomeless sperm. A cause of primary male infertility. *Andrologia.* 17:31-6.
- Ji, B.T., X.O. Shu, M.S. Linet, W. Zheng, S. Wacholder, Y.T. Gao, D.M. Ying, and F. Jin. 1997. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl Cancer Inst.* 89:238-44.

- Joshi, D.S., J. Yick, D. Murray, and M.L. Meistrich. 1990. Stage-dependent variation in the radiosensitivity of DNA in developing male germ cells. *Radiat Res.* 121:274-81.
- Kachilele, S.G., and D.A. New. 1988. Effects of temporary cooling, and of different explantation and storage conditions, on the subsequent development of post-implantation rat embryos in vitro. *Teratology.* 38:381-7.
- Kamimura, E., T. Nakashima, M. Ogawa, K. Ohwada, and N. Nakagata. 2003. Study of low-temperature (4 degrees C) transport of mouse two-cell embryos enclosed in oviducts. *Comp Med.* 53:393-6.
- Kaneko, T., K. Fukumoto, Y. Haruguchi, T. Kondo, H. Machida, M. Koga, Y. Nakagawa, S. Tsuchiyama, K. Saiki, S. Noshiha, and N. Nakagata. 2009. Fertilization of C57BL/6 mouse sperm collected from cauda epididymides after preservation or transportation at 4 degrees C using laser-microdissected oocytes. *Cryobiology.* 59:59-62.
- Kasai, M. 1986. Nonfreezing technique for short-term storage of mouse embryos. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 3:10-4.
- Kasai, M., K. Niwa, and A. Iritani. 1983. Protective effect of sucrose on the survival of mouse and rat embryos stored at 0 degree C. *J Reprod Fertil.* 68:377-80.
- Kasimanickam, R., V. Kasimanickam, C.D. Thatcher, R.L. Nebel, and B.G. Cassell. 2006a. Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. *Theriogenology.*
- Kasimanickam, R., R.L. Nebel, I.D. Peeler, W.L. Silvia, K.T. Wolf, A.J. McAllister, and B.G. Cassell. 2006b. Breed differences in competitive indices of Holstein and Jersey bulls and their association with sperm DNA fragmentation index and plasma membrane integrity. *Theriogenology.* 66:1307-15.
- Katkov, II, and P. Mazur. 1998. Influence of centrifugation regimes on motility, yield, and cell associations of mouse spermatozoa. *J Androl.* 19:232-41.
- Katz, D.F., E.Z. Drobni, and J.W. Overstreet. 1989. Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. *Gamete Res.* 22:443-69.
- Katz, D.F., P. Morales, S.J. Samuels, and J.W. Overstreet. 1990. Mechanisms of filtration of morphologically abnormal human sperm by cervical mucus. *Fertil Steril.* 54:513-6.
- Katz, D.F., and R. Yanagimachi. 1981. Movement characteristics of hamster and guinea pig spermatozoa upon attachment to the zona pellucida. *Biol Reprod.* 25:785-91.
- Kawano, N., and M. Yoshida. 2007. Semen-coagulating protein, SVS2, in mouse seminal plasma controls sperm fertility. *Biol Reprod.* 76:353-61.
- Kawase, Y., T. Iwata, O. Ueda, N. Kamada, T. Tachibe, Y. Aoki, K. Jishage, and H. Suzuki. 2002. Effect of partial incision of the zona pellucida by piezo-micromanipulator for in vitro fertilization using frozen-thawed mouse spermatozoa on the developmental rate of embryos transferred at the 2-cell stage. *Biol Reprod.* 66:381-5.

- Kholkute, S.D., J. Rodriguez, R.G. Rawlins, and W.R. Dukelow. 1994. Glass wool column filtration: effects on motility, viability, and fertilizing ability of epididymal spermatozoa from mice. *Lab Anim Sci.* 44:537-9.
- Kigami, D., N. Minami, H. Takayama, and H. Imai. 2003. MuERV-L is one of the earliest transcribed genes in mouse one-cell embryos. *Biol Reprod.* 68:651-4.
- Kim, S.H., D.H. Yu, and Y.J. Kim. Effects of cryopreservation on phosphatidylserine translocation, intracellular hydrogen peroxide, and DNA integrity in canine sperm. *Theriogenology.* 73:282-92.
- Kito, S., and Y. Ohta. 2005. Medium effects on capacitation and sperm penetration through the zona pellucida in inbred BALB/c spermatozoa. *Zygote.* 13:145-53.
- Knight, J., and A. Abbott. 2002. Full house. *Nature.* 417:785-6.
- Kodama, H., R. Yamaguchi, J. Fukuda, H. Kasai, and T. Tanaka. 1997. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril.* 68:519-24.
- Kong, I.K., S.I. Lee, S.G. Cho, S.K. Cho, and C.S. Park. 2000. Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology.* 53:1817-26.
- Korsmeyer, S.J., J.R. Shutter, D.J. Veis, D.E. Merry, and Z.N. Oltvai. 1993. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol.* 4:327-32.
- Koruji, M., M. Movahedin, S.J. Mowla, H. Gourabi, and A.J. Arfaee. 2008. The morphological changes of adult mouse testes after 60Co gamma-Radiation. *Iran Biomed J.* 12:35-42.
- Koshimoto, C., E. Gamliel, and P. Mazur. 2000. Effect of osmolality and oxygen tension on the survival of mouse sperm frozen to various temperatures in various concentrations of glycerol and raffinose. *Cryobiology.* 41:204-31.
- Koshimoto, C., and P. Mazur. 2002. Effects of cooling and warming rate to and from -70 degrees C, and effect of further cooling from -70 to -196 degrees C on the motility of mouse spermatozoa. *Biol Reprod.* 66:1477-84.
- Krishna, A. 1997. The relationship between spermatozoa and epithelium of the female genital tract during sperm storage in the greater yellow bats (*Scotophilus heathi*): the light and electronmicroscopic observations. *Proc Natl Sci Counc Repub China B.* 21:31-6.
- Krutzsch, P.H., E.G. Crichton, and R.B. Nagle. 1982. Studies on prolonged spermatozoa survival in Chiroptera: a morphological examination of storage and clearance of intrauterine and cauda epididymal spermatozoa in the bats *Myotis lucifugus* and *M. velifer*. *Am J Anat.* 165:421-34.
- Krzanowska, H. 1974. The passage of abnormal spermatozoa through the uterotubal junction of the mouse. *J Reprod Fertil.* 38:81-90.

- Krzanowska, H., J. Styrna, and B. Wabik-Sliz. 1995. Analysis of sperm quality in recombinant inbred mouse strains: correlation of sperm head shape with sperm abnormalities and with the incidence of supplementary spermatozoa in the perivitelline space. *J Reprod Fertil.* 104:347-54.
- Kusakabe, H., M.A. Szczygiel, D.G. Whittingham, and R. Yanagimachi. 2001. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:13501-6.
- Larson, K.L., C.J. DeJonge, A.M. Barnes, L.K. Jost, and D.P. Evenson. 2000. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod.* 15:1717-22.
- Larsson, B. 1988. Distribution of spermatozoa in the genital tract of heifers inseminated with large numbers of abnormal spermatozoa. *Zentralbl Veterinarmed A.* 35:721-8.
- Larsson, B., and H. Rodriguez-Martinez. 2000. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? *Anim Reprod Sci.* 60-61:327-36.
- Latendresse, J.R., A.R. Warbritton, H. Jonassen, and D.M. Creasy. 2002. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol Pathol.* 30:524-33.
- Lazzari, G., S. Colleoni, I. Lagutina, G. Crotti, P. Turini, I. Tessaro, D. Brunetti, R. Duchi, and C. Galli. Short-term and long-term effects of embryo culture in the surrogate sheep oviduct versus in vitro culture for different domestic species. *Theriogenology.* 73:748-57.
- Lee, H.L., S.H. Kim, D.B. Ji, and Y.J. Kim. 2009. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. *J Vet Sci.* 10:249-55.
- Lewis, S.E., and R.J. Aitken. 2005. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res.* 322:33-41.
- Lindner, G.M., G.B. Anderson, R.H. BonDurant, and P.T. Cupps. 1983. Survival of bovine embryos stored at 4 degrees C. *Theriogenology.* 20:311-9.
- Lindner, G.M., and R.W. Wright, Jr. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology.* 20:407-16.
- Linfor, J.J., and S.A. Meyers. 2002. Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell gel electrophoresis. *J Androl.* 23:107-13.
- Liu, D.Y., and H.W. Baker. 1992a. Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro. *J Reprod Fertil.* 94:71-84.
- Liu, D.Y., and H.W. Baker. 1992b. Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertil Steril.* 58:1178-84.

- Liu, D.Y., and H.W. Baker. 1994. Acrosome status and morphology of human spermatozoa bound to the zona pellucida and oolemma determined using oocytes that failed to fertilize in vitro. *Hum Reprod.* 9:673-9.
- Liu, D.Y., and H.W. Baker. 2007. Human sperm bound to the zona pellucida have normal nuclear chromatin as assessed by acridine orange fluorescence. *Hum Reprod.* 22:1597-602.
- Liu, L., L.M. Nutter, N. Law, and C. McKelvie. 2009. Sperm freezing and in vitro fertilization in three substrains of C57BL/6 mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 48:39-43.
- Lopes, S., A. Jurisicova, J.G. Sun, and R.F. Casper. 1998a. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 13:896-900.
- Lopes, S., J.G. Sun, A. Jurisicova, J. Meriano, and R.F. Casper. 1998b. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 69:528-32.
- Lue, Y., A.P. Hikim, C. Wang, M. Im, A. Leung, and R.S. Swerdloff. 2000. Testicular heat exposure enhances the suppression of spermatogenesis by testosterone in rats: the "two-hit" approach to male contraceptive development. *Endocrinology.* 141:1414-24.
- Magelssen, H., M. Brydoy, and S.D. Fossa. 2006. The effects of cancer and cancer treatments on male reproductive function. *Nat Clin Pract Urol.* 3:312-22.
- Mahabir, E., D. Bulian, J. Needham, and J. Schmidt. 2009. Lack of transmission of mouse minute virus (MMV) from in vitro-produced embryos to recipients and pups due to the presence of cumulus cells during the in vitro fertilization process. *Biol Reprod.* 81:531-8.
- Maione, B., C. Pittoggi, L. Achene, R. Lorenzini, and C. Spadafora. 1997. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA Cell Biol.* 16:1087-97.
- Manicardi, G.C., P.G. Bianchi, S. Pantano, P. Azzoni, D. Bizzaro, U. Bianchi, and D. Sakkas. 1995. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod.* 52:864-7.
- Manicardi, G.C., A. Tombacco, D. Bizzaro, U. Bianchi, P.G. Bianchi, and D. Sakkas. 1998. DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochem J.* 30:33-9.
- Marcon, L., and G. Boissonneault. 2004. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod.* 70:910-8.
- Marchetti, F., J. Essers, R. Kanaar, and A.J. Wyrobek. 2007. Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:17725-9.
- Marchetti, F., and A.J. Wyrobek. 2005. Mechanisms and consequences of paternally-transmitted chromosomal abnormalities. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 75:112-29.

- Marchetti, F., and A.J. Wyrobek. 2008. DNA repair decline during mouse spermiogenesis results in the accumulation of heritable DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 7:572-81.
- Martin-Caballero, J., A. Naranjo, and E. de la Cueva. 2003. Genetically modified mouse health reporting: a need for global standardization. *Lab Anim (NY)*. 32:38-45.
- Martin, G., O. Sabido, P. Durand, and R. Levy. 2004. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod*. 71:28-37.
- Martins, C.F., S.N. Bao, M.N. Dode, G.A. Correa, and R. Rumpf. 2007a. Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm. *Theriogenology*. 67:1307-15.
- Martins, C.F., M.N. Dode, S.N. Bao, and R. Rumpf. 2007b. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. *Genet Mol Res*. 6:94-104.
- Massip, A. 2001. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Domest Anim*. 36:49-55.
- Matos, L., D. Stevenson, F. Gomes, J.L. Silva-Carvalho, and H. Almeida. 2009. Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells. *Mol Hum Reprod*. 15:411-9.
- Matsuda, Y., N. Seki, T. Utsugi-Takeuchi, and I. Tobari. 1989. X-ray- and mitomycin C (MMC)-induced chromosome aberrations in spermiogenic germ cells and the repair capacity of mouse eggs for the X-ray and MMC damage. *Mutat Res*. 211:65-75.
- Mazur, P. 1990. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys*. 17:53-92.
- Mazur, P., Katkov, II, N. Katkova, and J.K. Critser. 2000. The enhancement of the ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high concentrations of glycerol and the presence of an *Escherichia coli* membrane preparation (Oxyrase) to lower the oxygen concentration. *Cryobiology*. 40:187-209.
- Mazur, P., and C. Koshimoto. 2002. Is intracellular ice formation the cause of death of mouse sperm frozen at high cooling rates? *Biol Reprod*. 66:1485-90.
- McCarthy, S., and W.S. Ward. 2000. Interaction of exogenous DNA with the nuclear matrix of live spermatozoa. *Mol Reprod Dev*. 56:235-7.
- McPherson, S., and F.J. Longo. 1993a. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem*. 37:109-28.
- McPherson, S.M., and F.J. Longo. 1992. Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol Reprod Dev*. 31:268-79.
- McPherson, S.M., and F.J. Longo. 1993b. Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev Biol*. 158:122-30.

- Meistrich, M.L. 1986. Critical components of testicular function and sensitivity to disruption. *Biol Reprod.* 34:17-28.
- Melin, J., A. Lee, K. Foygel, D.E. Leong, S.R. Quake, and M.W. Yao. 2009. In vitro embryo culture in defined, sub-microliter volumes. *Dev Dyn.* 238:950-5.
- Menezo, Y.J. 2006. Paternal and maternal factors in preimplantation embryogenesis: interaction with the biochemical environment. *Reprod Biomed Online.* 12:616-21.
- Miao, D.Q., S.F. Ma, X.Y. Liu, H.S. Sui, X. Zhang, T.W. Qiao, and J.H. Tan. 2007. Effects of delayed excision of oviducts/ovaries on mouse oocytes and embryos. *Mol Reprod Dev.* 74:468-77.
- Mieusset, R., B. Bengoudifa, and L. Bujan. 2007. Effect of posture and clothing on scrotal temperature in fertile men. *J Androl.* 28:170-5.
- Mieusset, R., L. Bujan, A. Mansat, and F. Pontonnier. 1992. [Scrotal hyperthermia and male infertility]. *Prog Urol.* 2:31-5; discussion 35-6.
- Mieusset, R., L. Bujan, C. Mondinat, A. Mansat, F. Pontonnier, and H. Grandjean. 1987. Association of scrotal hyperthermia with impaired spermatogenesis in infertile men. *Fertil Steril.* 48:1006-11.
- Mieusset, R., P.I. Quintana Casares, L.G. Sanchez-Partida, S.F. Sowerbutts, J.L. Zupp, and B.P. Setchell. 1991. The effects of moderate heating of the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on body temperature, respiratory rate, spermatozoa output and motility, and on fertility and embryonic survival in ewes inseminated with frozen semen. *Ann N Y Acad Sci.* 637:445-58.
- Miller, D., M. Brinkworth, and D. Iles. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction.* 139:287-301.
- Mitchell, J.R., P.L. Senger, and J.L. Rosenberger. 1985. Distribution and retention of spermatozoa with acrosomal and nuclear abnormalities in the cow genital tract. *J Anim Sci.* 61:956-67.
- Miyoshi, I., K. Ishikawa, M. Kasai, and N. Kasai. 1992. Useful short-range transport of mouse embryos by means of a nonfreezing technique. *Lab Anim Sci.* 42:198-201.
- Morgan, H.D., X.L. Jin, A. Li, E. Whitelaw, and C. O'Neill. 2008. The culture of zygotes to the blastocyst stage changes the postnatal expression of an epigenetically labile allele, agouti viable yellow, in mice. *Biol Reprod.* 79:618-23.
- Morgan, W.F. 2003a. Is there a common mechanism underlying genomic instability, bystander effects and other nontargeted effects of exposure to ionizing radiation? *Oncogene.* 22:7094-9.
- Morgan, W.F. 2003b. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro. *Radiat Res.* 159:567-80.

- Morgan, W.F. 2003c. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: II. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vivo, clastogenic factors and transgenerational effects. *Radiat Res.* 159:581-96.
- Morrell, J.M., A. Johannisson, A.M. Dalin, L. Hammar, T. Sandebert, and H. Rodriguez-Martinez. 2008. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta Vet Scand.* 50:2.
- Morris, I.D., S. Iltott, L. Dixon, and D.R. Brison. 2002. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod.* 17:990-8.
- Moskovtsev, S.I., J. Willis, A. Azad, and J.B. Mullen. 2005. Sperm DNA integrity: correlation with sperm plasma membrane integrity in semen evaluated for male infertility. *Arch Androl.* 51:33-40.
- Movassaghi, S., G. Saki, F. Javadnia, M. Panahi, M. Mahmoudi, and F. Rhim. 2009. Effects of methyl-beta-cyclodextrin and cholesterol on cryosurvival of spermatozoa from C57BL/6 mouse. *Pak J Biol Sci.* 12:19-25.
- Muratori, M., M. Maggi, S. Spinelli, E. Filimberti, G. Forti, and E. Baldi. 2003. Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl.* 24:253-62.
- Myles, D.G., and P. Primakoff. 1997. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod.* 56:320-7.
- Nakagata, N. 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J Reprod Fertil.* 87:479-83.
- Nakagata, N. 1992. Production of normal young following insemination of frozen-thawed mouse spermatozoa into fallopian tubes of pseudopregnant females. *Jikken Dobutsu.* 41:519-22.
- Nakagata, N. 2000. Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Mamm Genome.* 11:572-6.
- Nakagata, N., M. Okamoto, O. Ueda, and H. Suzuki. 1997. Positive effect of partial zona-pellucida dissection on the in vitro fertilizing capacity of cryopreserved C57BL/6J transgenic mouse spermatozoa of low motility. *Biol Reprod.* 57:1050-5.
- Nakamura, K., and Y. Tsunoda. 1992. Viability of nuclei of two-cell mouse embryos stored at 4 degrees C and fused with blastomeres of fresh two-cell embryos. *Cryobiology.* 29:493-9.
- Nakanishi, T., A. Isotani, R. Yamaguchi, M. Ikawa, T. Baba, S.S. Suarez, and M. Okabe. 2004. Selective passage through the uterotubal junction of sperm from a mixed population produced by chimeras of calmegin-knockout and wild-type male mice. *Biol Reprod.* 71:959-65.
- Nasr-Esfahani, M.H., M. Salehi, S. Razavi, M. Anjomshoa, S. Rozbahani, F. Moulavi, and M. Mardani. 2005. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online.* 11:198-205.

- Neuber, E., C.M. Luetjens, A.W. Chan, and G.P. Schatten. 2002. Analysis of DNA fragmentation of in vitro cultured bovine blastocysts using TUNEL. *Theriogenology*. 57:2193-202.
- Nishizono, H., M. Shioda, T. Takeo, T. Irie, and N. Nakagata. 2004. Decrease of fertilizing ability of mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury. *Biol Reprod*. 71:973-8.
- Ogonuki, N., K. Mochida, H. Miki, K. Inoue, M. Fray, T. Iwaki, K. Moriwaki, Y. Obata, K. Morozumi, R. Yanagimachi, and A. Ogura. 2006. Spermatozoa and spermatids retrieved from frozen reproductive organs or frozen whole bodies of male mice can produce normal offspring. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:13098-103.
- Olds-Clarke, P., and W. Wivell. 1992. Impaired transport and fertilization in vivo of calcium-treated spermatozoa from +/+ or congenic tw32/+ mice. *Biol Reprod*. 47:621-8.
- Oliva, R. 2006. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*. 12:417-35.
- Oltvai, Z.N., C.L. Millman, and S.J. Korsmeyer. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 74:609-19.
- Ostermeier, G.C., M.V. Wiles, J.S. Farley, and R.A. Taft. 2008. Conserving, distributing and managing genetically modified mouse lines by sperm cryopreservation. *PLoS One*. 3:e2792.
- Otoi, T., K. Yamamoto, N. Horikita, S. Tachikawa, and T. Suzuki. 1999. Relationship between dead cells and DNA fragmentation in bovine embryos produced in vitro and stored at 4 degrees C. *Mol Reprod Dev*. 54:342-7.
- Overstreet, J.W., and G.W. Cooper. 1978a. Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit: I. The rapid transit phase of transport. *Biol Reprod*. 19:101-14.
- Overstreet, J.W., and G.W. Cooper. 1978b. Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit: II. The sustained phase of transport. *Biol Reprod*. 19:115-32.
- Overstreet, J.W., and G.W. Cooper. 1979. Effect of ovulation and sperm motility on the migration of rabbit spermatozoa to the site of fertilization. *J Reprod Fertil*. 55:53-9.
- Overstreet, J.W., R. Yanagimachi, D.F. Katz, K. Hayashi, and F.W. Hanson. 1980. Penetration of human spermatozoa into the human zona pellucida and the zona-free hamster egg: a study of fertile donors and infertile patients. *Fertil Steril*. 33:534-42.
- Ozmen, B., N. Koutlaki, M. Youssry, K. Diedrich, and S. Al-Hasani. 2007. DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. *Reprod Biomed Online*. 14:384-95.
- Paasch, U., R.K. Sharma, A.K. Gupta, S. Grunewald, E.J. Mascha, A.J. Thomas, Jr., H.J. Glander, and A. Agarwal. 2004. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol Reprod*. 71:1828-37.

- Palomo, M.J., T. Mogas, D. Izquierdo, and M.T. Paramio. The influence of sperm concentration, length of the gamete co-culture and the evolution of different sperm parameters on the in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes. *Zygote*:1-11.
- Papaioannou, V.E., and K.M. Ebert. 1986. Development of fertilized embryos transferred to oviducts of immature mice. *J Reprod Fertil*. 76:603-8.
- Parker-Thornburg, J.V., J.L. Alana, C.N. Smith, M. Detry, M.L. Rojas, and K.K. Baskin. 2005. Cryopreserved morulae can be used to efficiently generate germline-transmitting chimeras by blastocyst injection. *Transgenic Res*. 14:685-90.
- Parks, J.E., and J.K. Graham. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38:209-22.
- Parks, J.E., and D.V. Lynch. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*. 29:255-66.
- Paul, C., D.W. Melton, and P.T. Saunders. 2008a. Do heat stress and deficits in DNA repair pathways have a negative impact on male fertility? *Mol Hum Reprod*. 14:1-8.
- Paul, C., A.A. Murray, N. Spears, and P.T. Saunders. 2008b. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction*. 136:73-84.
- Paul, C., S. Teng, and P.T. Saunders. 2009. A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. *Biol Reprod*. 80:913-9.
- Payne, J.F., D.J. Raburn, G.M. Couchman, T.M. Price, M.G. Jamison, and D.K. Walmer. 2005. Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril*. 84:356-64.
- Peaston, A.E., A.V. Evsikov, J.H. Graber, W.N. de Vries, A.E. Holbrook, D. Solter, and B.B. Knowles. 2004. Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev Cell*. 7:597-606.
- Pegg, D.E. 2007. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol*. 368:39-57.
- Perez-Crespo, M., P. Moreira, B. Pintado, and A. Gutierrez-Adan. 2008a. Factors from damaged sperm affect its DNA integrity and its ability to promote embryo implantation in mice. *J Androl*. 29:47-54.
- Perez-Crespo, M., B. Pintado, and A. Gutierrez-Adan. 2008b. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Mol Reprod Dev*. 75:40-7.
- Peris, S.I., A. Morrier, M. Dufour, and J.L. Bailey. 2004. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J Androl*. 25:224-33.

- Perreault, S.D., R.J. Aitken, H.W. Baker, D.P. Evenson, G. Huszar, D.S. Irvine, I.D. Morris, R.A. Morris, W.A. Robbins, D. Sakkas, M. Spano, and A.J. Wyrobek. 2003. Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. *Adv Exp Med Biol.* 518:253-68.
- Piehler, E., A.M. Petrunkina, M. Ekhlesi-Hundrieser, and E. Topfer-Petersen. 2006. Dynamic quantification of the tyrosine phosphorylation of the sperm surface proteins during capacitation. *Cytometry A.* 69:1062-70.
- Pintado, B., and A. Gutierrez-Adan. 1999. Transgenesis in large domestic species: future development for milk modification. *Reprod Nutr Dev.* 39:535-44.
- Pintado, B., J.D. Hourcade, M. Pérez-Crespo, and A. Gutiérrez-Adán. 2008. Intraoviductal insemination with frozen C57Bl/6 sperm increases fertility rate compared to standard IVF P.a.A.o.t.t.T.T.M. (TT2008), editor. Springer Netherlands, Toronto, Canada.
- Piomboni, P., E. Bruni, S. Capitani, L. Gambera, E. Moretti, A. La Marca, V. De Leo, and B. Baccetti. 2006. Ultrastructural and DNA fragmentation analyses in swim-up selected human sperm. *Arch Androl.* 52:51-9.
- Preis, K.A., E.M. Carnevale, M.A. Coutinho da Silva, V. Caracciolo di Brienza, G.M. Gomes, L.J. Maclellan, and E.L. Squires. 2004. In vitro maturation and transfer of equine oocytes after transport of ovaries at 12 or 22 degrees C. *Theriogenology.* 61:1215-23.
- Primakoff, P., and D.G. Myles. 2002. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science.* 296:2183-5.
- Purpera, M.N., A.M. Giraldo, C.B. Ballard, D. Hylan, R.A. Godke, and K.R. Bondioli. 2009. Effects of culture medium and protein supplementation on mRNA expression of in vitro produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev.* 76:783-93.
- Racey, P.A. 1979. The prolonged storage and survival of spermatozoa in Chiroptera. *J Reprod Fertil.* 56:391-402.
- Racey, P.A., T.A. Uchida, T. Mori, M.I. Avery, and M.B. Fenton. 1987. Sperm-epithelium relationships in relation to the time of insemination in little brown bats (*Myotis lucifugus*). *J Reprod Fertil.* 80:445-54.
- Rall, W.F., and G.M. Fahy. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature.* 313:573-5.
- Rall, W.F., P.M. Schmidt, X. Lin, S.S. Brown, A.C. Ward, and C.T. Hansen. 2000. Factors affecting the efficiency of embryo cryopreservation and rederivation of rat and mouse models. *ILAR J.* 41:221-7.
- Ramirez, M.A., E. Pericuesta, R. Fernandez-Gonzalez, P. Moreira, B. Pintado, and A. Gutierrez-Adan. 2006. Transcriptional and post-transcriptional regulation of retrotransposons IAP and MuERV-L affect pluripotency of mice ES cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 4:55.
- Ramos, L., and A.M. Wetzels. 2001. Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay. *Hum Reprod.* 16:1703-7.

- Ribeiro, B.I., L.B. Love, Y.H. Choi, and K. Hinrichs. 2008. Transport of equine ovaries for assisted reproduction. *Anim Reprod Sci.* 108:171-9.
- Rizos, D., M.A. Ramirez, B. Pintado, P. Lonergan, and A. Gutierrez-Adan. Culture of bovine embryos in intermediate host oviducts with emphasis on the isolated mouse oviduct. *Theriogenology.* 73:777-85.
- Rockett, J.C., F.L. Mapp, J.B. Garges, J.C. Luft, C. Mori, and D.J. Dix. 2001. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biol Reprod.* 65:229-39.
- Rodriguez-Martinez, H. 2007. State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reprod Fertil Dev.* 19:91-101.
- Romao, G.S., M.C. Araujo, A.S. de Melo, P.A. de Albuquerque Salles Navarro, R.A. Ferriani, and R.M. Dos Reis. Oocyte diameter as a predictor of fertilization and embryo quality in assisted reproduction cycles. *Fertil Steril.* 93:621-5.
- Rowley, M.J., D.R. Leach, G.A. Warner, and C.G. Heller. 1974. Effect of graded doses of ionizing radiation on the human testis. *Radiat Res.* 59:665-78.
- Royere, D., S. Hamamah, J.C. Nicolle, C. Barthelemy, and J. Lansac. 1988. Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: fluorescence acridine orange staining and Feulgen-DNA cytophotometric studies. *Gamete Res.* 21:51-7.
- Royere, D., S. Hamamah, J.C. Nicolle, and J. Lansac. 1991. Chromatin alterations induced by freeze-thawing influence the fertilizing ability of human sperm. *Int J Androl.* 14:328-32.
- Rubes, J., S.G. Selevan, D.P. Evenson, D. Zudova, M. Vozdova, Z. Zudova, W.A. Robbins, and S.D. Perreault. 2005. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod.* 20:2776-83.
- Saacke, R.G., J.C. Dalton, S. Nadir, R.L. Nebel, and J.H. Bame. 2000. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim Reprod Sci.* 60-61:663-77.
- Saacke, R.G., J.M. DeJarnette, J.H. Bame, D.S. Karabinus, and S.S. Whitman. 1998. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle? *Theriogenology.* 50:117-28.
- Sailer, B.L., L.K. Jost, and D.P. Evenson. 1995. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl.* 16:80-7.
- Sakkas, D., E. Mariethoz, G. Manicardi, D. Bizzaro, P.G. Bianchi, and U. Bianchi. 1999. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod.* 4:31-7.
- Sakkas, D., O. Moffatt, G.C. Manicardi, E. Mariethoz, N. Tarozzi, and D. Bizzaro. 2002. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod.* 66:1061-7.

- Sakkas, D., F. Urner, D. Bizzaro, G. Manicardi, P.G. Bianchi, Y. Shoukir, and A. Campana. 1998. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod.* 13 Suppl 4:11-9.
- Sakurai, T., M. Kimura, and M. Sato. 2005. Temporary developmental arrest after storage of fertilized mouse oocytes at 4 degrees C: effects on embryonic development, maternal mRNA processing and cell cycle. *Mol Hum Reprod.* 11:325-33.
- Saleh, R.A., A. Agarwal, R.K. Sharma, T.M. Said, S.C. Sikka, and A.J. Thomas, Jr. 2003. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril.* 80:1431-6.
- Sasso-Cerri, E., and S.M. Miraglia. 2002. In situ demonstration of both TUNEL-labeled germ cell and Sertoli cell in the cimetidine-treated rats. *Histol Histopathol.* 17:411-7.
- Satake, N., R.M. Elliott, P.F. Watson, and W.V. Holt. 2006. Sperm selection and competition in pigs may be mediated by the differential motility activation and suppression of sperm subpopulations within the oviduct. *J Exp Biol.* 209:1560-72.
- Sato, M., and M. Kimura. 2001. Intrabursal transfer of spermatozoa (ITS): a new route for artificial insemination of mice. *Theriogenology.* 55:1881-90.
- Sato, M., A. Nagashima, T. Watanabe, and M. Kimura. 2002. Comparison of intrabursal transfer of spermatozoa, a new method for artificial insemination in mice, with intraoviductal transfer of spermatozoa. *J Assist Reprod Genet.* 19:523-30.
- Sato, M., M. Tanigawa, and T. Watanabe. 2004. Effect of time of ovulation on fertilization after intrabursal transfer of spermatozoa (ITS): improvement of a new method for artificial insemination in mice. *Theriogenology.* 62:1417-29.
- Scott, M.A. 2000. A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Anim Reprod Sci.* 60-61:337-48.
- Schuberth, H.J., U. Taylor, H. Zerbe, D. Waberski, R. Hunter, and D. Rath. 2008. Immunological responses to semen in the female genital tract. *Theriogenology.* 70:1174-81.
- Seli, E., D.K. Gardner, W.B. Schoolcraft, O. Moffatt, and D. Sakkas. 2004. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 82:378-83.
- Setchell, B.P. 1998. The Parkes Lecture. Heat and the testis. *J Reprod Fertil.* 114:179-94.
- Setchell, B.P., G. Ekpe, J.L. Zupp, and M.A. Surani. 1998. Transient retardation in embryo growth in normal female mice made pregnant by males whose testes had been heated. *Hum Reprod.* 13:342-7.
- Shalgi, R., T.T. Smith, and R. Yanagimachi. 1992. A quantitative comparison of the passage of capacitated and uncapacitated hamster spermatozoa through the uterotubal junction. *Biol Reprod.* 46:419-24.

- Shaman, J.A., R. Prisztoka, and W.S. Ward. 2006. Topoisomerase IIB and an extracellular nuclease interact to digest sperm DNA in an apoptotic-like manner. *Biol Reprod.* 75:741-8.
- Sharma, R., Said, TM, Agarwal, A 2004. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl.* 6:139-148.
- Sharma, R.K., T. Said, and A. Agarwal. 2004. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl.* 6:139-48.
- Sherman, J.K., and T.P. Lin. 1959. Temperature shock and cold-storage of unfertilized mouse eggs. *Fertil Steril.* 10:384-96.
- Shimura, T., M. Inoue, M. Taga, K. Shiraishi, N. Uematsu, N. Takei, Z.M. Yuan, T. Shinohara, and O. Niwa. 2002a. p53-dependent S-phase damage checkpoint and pronuclear cross talk in mouse zygotes with X-irradiated sperm. *Mol Cell Biol.* 22:2220-8.
- Shimura, T., M. Toyoshima, M. Taga, K. Shiraishi, N. Uematsu, M. Inoue, and O. Niwa. 2002b. The novel surveillance mechanism of the Trp53-dependent s-phase checkpoint ensures chromosome damage repair and preimplantation-stage development of mouse embryos fertilized with x-irradiated sperm. *Radiat Res.* 158:735-42.
- Si, W., H. Men, J.D. Benson, and J.K. Critser. 2009. Osmotic characteristics and fertility of murine spermatozoa collected in different solutions. *Reproduction.* 137:215-23.
- Silva, P.F., B.M. Gadella, B. Colenbrander, and B.A. Roelen. 2007. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after the first cleavage. *Theriogenology.* 67:609-19.
- Singh, N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice, and E.L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175:184-91.
- Siu, M.K., E.S. Wong, H.Y. Chan, H.Y. Ngan, K.Y. Chan, and A.N. Cheung. 2008. Overexpression of NANOG in gestational trophoblastic diseases: effect on apoptosis, cell invasion, and clinical outcome. *Am J Pathol.* 173:1165-72.
- Sleight, S.B., P.V. Miranda, N.W. Plaskett, B. Maier, J. Lysiak, H. Scrable, J.C. Herr, and P.E. Visconti. 2005. Isolation and proteomic analysis of mouse sperm detergent-resistant membrane fractions: evidence for dissociation of lipid rafts during capacitation. *Biol Reprod.* 73:721-9.
- Smith, T.T., F. Koyanagi, and R. Yanagimachi. 1988. Quantitative comparison of the passage of homologous and heterologous spermatozoa through the uterotubal junction of the golden hamster. *Gamete Res.* 19:227-34.
- Smith, T.T., and R. Yanagimachi. 1989. Capacitation status of hamster spermatozoa in the oviduct at various times after mating. *J Reprod Fertil.* 86:255-61.
- Smith, T.T., and R. Yanagimachi. 1990. The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct: the importance of sperm-epithelium contact for sperm survival. *Biol Reprod.* 42:450-7.

- Songsasen, N., K.J. Betteridge, and S.P. Leibo. 1997. Birth of live mice resulting from oocytes fertilized in vitro with cryopreserved spermatozoa. *Biol Reprod.* 56:143-52.
- Songsasen, N., and S.P. Leibo. 1997a. Cryopreservation of mouse spermatozoa. I. Effect of seeding on fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa. *Cryobiology.* 35:240-54.
- Songsasen, N., and S.P. Leibo. 1997b. Cryopreservation of mouse spermatozoa. II. Relationship between survival after cryopreservation and osmotic tolerance of spermatozoa from three strains of mice. *Cryobiology.* 35:255-69.
- Sotolongo, B., T.T. Huang, E. Isenberger, and W.S. Ward. 2005. An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *J Androl.* 26:272-80.
- Sotolongo, B., E. Lino, and W.S. Ward. 2003. Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biol Reprod.* 69:2029-35.
- Spano, M., J.P. Bonde, H.I. Hjollund, H.A. Kolstad, E. Cordelli, and G. Leter. 2000. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril.* 73:43-50.
- Spano, M., E. Seli, D. Bizzaro, G.C. Manicardi, and D. Sakkas. 2005. The significance of sperm nuclear DNA strand breaks on reproductive outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 17:255-60.
- Stewart-Savage, J., and B.D. Bavister. 1988. Success of fertilization in golden hamsters is a function of the relative gamete ratio. *Gamete Res.* 21:1-10.
- Stokes, M.P., and W.M. Michael. 2004. A novel replication arrest pathway in response to DNA damage. *Cell Cycle.* 3:126-7.
- Storey, B.T., E.E. Noiles, and K.A. Thompson. 1998. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology.* 37:46-58.
- Suarez, S.S. 1987. Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations in situ. *Biol Reprod.* 36:203-10.
- Suarez, S.S. 2007. Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. *Reprod Fertil Dev.* 19:103-10.
- Suarez, S.S., K. Brockman, and R. Lefebvre. 1997. Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after artificial insemination: the physical environment of the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod.* 56:447-53.
- Suarez, S.S., and R.A. Osman. 1987. Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract. *Biol Reprod.* 36:1191-8.
- Suarez, S.S., and A.A. Pacey. 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update.* 12:23-37.

- Suh, R.S., X. Zhu, N. Phadke, D.A. Ohl, S. Takayama, and G.D. Smith. 2006. IVF within microfluidic channels requires lower total numbers and lower concentrations of sperm. *Hum Reprod.* 21:477-83.
- Sumransap, P., P. Tummaruk, and A. Kunavongkrit. 2007. Sperm distribution in the reproductive tract of sows after intrauterine insemination. *Reprod Domest Anim.* 42:113-7.
- Sun, J.G., A. Jurisicova, and R.F. Casper. 1997. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod.* 56:602-7.
- Syms, A.J., A.R. Johnson, L.I. Lipshultz, and R.G. Smith. 1985. Effect of aging and cold temperature storage of hamster ova as assessed in the sperm penetration assay. *Fertil Steril.* 43:766-72.
- Szczygiel, M.A., S. Moisyadi, and W.S. Ward. 2003. Expression of foreign DNA is associated with paternal chromosome degradation in intracytoplasmic sperm injection-mediated transgenesis in the mouse. *Biol Reprod.* 68:1903-10.
- Szczygiel, M.A., and W.S. Ward. 2002. Combination of dithiothreitol and detergent treatment of spermatozoa causes paternal chromosomal damage. *Biol Reprod.* 67:1532-7.
- Sztejn, J.M., J.S. Farley, and L.E. Mobraaten. 2000. In vitro fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm. *Biol Reprod.* 63:1774-80.
- Sztejn, J.M., J.S. Farley, A.F. Young, and L.E. Mobraaten. 1997. Motility of cryopreserved mouse spermatozoa affected by temperature of collection and rate of thawing. *Cryobiology.* 35:46-52.
- Tada, N., M. Sato, J. Yamanoi, T. Mizorogi, K. Kasai, and S. Ogawa. 1990. Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *J Reprod Fertil.* 89:511-6.
- Taguma, K., C. Nakamura, A. Ozaki, C. Suzuki, A. Hachisu, K. Kobayashi, K. Mochida, A. Ogura, H. Kaneda, and S. Wakana. 2009. A practical novel method for ensuring stable capacitation of spermatozoa from cryopreserved C57BL/6J sperm suspension. *Exp Anim.* 58:395-401.
- Takeo, T., T. Hoshii, Y. Kondo, H. Toyodome, H. Arima, K. Yamamura, T. Irie, and N. Nakagata. 2008. Methyl-beta-cyclodextrin improves fertilizing ability of C57BL/6 mouse sperm after freezing and thawing by facilitating cholesterol efflux from the cells. *Biol Reprod.* 78:546-51.
- Takeo, T., T. Kaneko, Y. Haruguchi, K. Fukumoto, H. Machida, M. Koga, Y. Nakagawa, Y. Takeshita, T. Matsuguma, S. Tsuchiyama, N. Shimizu, T. Hasegawa, M. Goto, H. Miyachi, M. Anzai, E. Nakatsukasa, K. Nomaru, and N. Nakagata. 2009. Birth of mice from vitrified/warmed 2-cell embryos transported at a cold temperature. *Cryobiology.* 58:196-202.
- Takeo, T., and N. Nakagata. Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl-beta-cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. *Lab Anim.* 44:132-7.

- Takeshima, T., and Y. Toyoda. 1977. [Artificial insemination in the mouse with special reference to the effect of sperm numbers on the conception rate and litter size (author's transl)]. *Jikken Dobutsu*. 26:317-22.
- Tao, J., J. Du, F.W. Kleinhans, E.S. Critser, P. Mazur, and J.K. Critser. 1995. The effect of collection temperature, cooling rate and warming rate on chilling injury and cryopreservation of mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 104:231-6.
- Tarze, A., A. Deniaud, M. Le Bras, E. Maillier, D. Molle, N. Larochette, N. Zamzami, G. Jan, G. Kroemer, and C. Brenner. 2007. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene*. 26:2606-20.
- Tateno, H., Y. Kimura, and R. Yanagimachi. 2000. Sonication per se is not as deleterious to sperm chromosomes as previously inferred. *Biol Reprod*. 63:341-6.
- Taylor, U., D. Rath, H. Zerbe, and H.J. Schuberth. 2008. Interaction of intact porcine spermatozoa with epithelial cells and neutrophilic granulocytes during uterine passage. *Reprod Domest Anim*. 43:166-75.
- Taylor, U., H.J. Schuberth, D. Rath, H.W. Michelmann, C. Sauter-Louis, and H. Zerbe. 2009. Influence of inseminate components on porcine leucocyte migration in vitro and in vivo after pre- and post-ovulatory insemination. *Reprod Domest Anim*. 44:180-8.
- Tejada, R.I., J.C. Mitchell, A. Norman, J.J. Marik, and S. Friedman. 1984. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril*. 42:87-91.
- Tesarik, J. 2005. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reprod Biomed Online*. 10:370-5.
- Tesarik, J., E. Greco, and C. Mendoza. 2004. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod*. 19:611-5.
- Tesarik, J., R. Mendoza-Tesarik, and C. Mendoza. 2006. Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reprod Biomed Online*. 12:715-21.
- Thomson, L.K., S.D. Fleming, R.J. Aitken, G.N. De Iuliis, J.A. Zieschang, and A.M. Clark. 2009. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum Reprod*. 24:2061-70.
- Thomson, L.K., S.D. Fleming, K. Barone, J.A. Zieschang, and A.M. Clark. The effect of repeated freezing and thawing on human sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril*. 93:1147-56.
- Tomlinson, M.J., O. Moffatt, G.C. Manicardi, D. Bizzaro, M. Afnan, and D. Sakkas. 2001. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod*. 16:2160-5.
- Toner, M., E.G. Cravalho, J. Stachecki, T. Fitzgerald, R.G. Tompkins, M.L. Yarmush, and D.R. Armant. 1993. Nonequilibrium freezing of one-cell mouse embryos. Membrane integrity and developmental potential. *Biophys J*. 64:1908-21.

- Topfer-Petersen, E., A.M. Petrounkina, and M. Ekhlesi-Hundrieser. 2000. Oocyte-sperm interactions. *Anim Reprod Sci.* 60-61:653-62.
- Troedsson, M.H., I.K. Liu, and B.G. Crabo. 1998. Sperm transport and survival in the mare: a review. *Theriogenology.* 50:807-18.
- Tsunoda, Y., and M.C. Chang. 1975. Penetration of mouse eggs in vitro: optimal sperm concentration and minimal number of spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 44:139-42.
- Tulsiani, D.R. 2006. Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: an overview of their potential role in sperm maturation. *Mol Cell Endocrinol.* 250:58-65.
- Tummaruk, P., P. Sumransap, M. Techakumphu, and A. Kunavongkrit. 2007. Distribution of spermatozoa and embryos in the female reproductive tract after unilateral deep intra uterine insemination in the pig. *Reprod Domest Anim.* 42:603-9.
- Twigg, J.P., D.S. Irvine, and R.J. Aitken. 1998. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 13:1864-71.
- Van den Abbeel, E., and A.C. Van Steirteghem. 1987. Cryopreservation of in vitro cultured mouse preimplantation embryos. *Ann Biol Clin (Paris).* 45:460-3.
- Van Dyk, Q., S. Lanzendorf, P. Kolm, G.D. Hodgen, and M.C. Mahony. 2000. Incidence of aneuploid spermatozoa from subfertile men: selected with motility versus hemizona-bound. *Hum Reprod.* 15:1529-36.
- Verza, S., Jr., C.M. Feijo, and S.C. Esteves. 2009. Resistance of human spermatozoa to cryoinjury in repeated cycles of thaw-refreezing. *Int Braz J Urol.* 35:581-90; discussion 591.
- Virro, M.R., K.L. Larson-Cook, and D.P. Evenson. 2004. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril.* 81:1289-95.
- Wakayama, T., D.G. Whittingham, and R. Yanagimachi. 1998. Production of normal offspring from mouse oocytes injected with spermatozoa cryopreserved with or without cryoprotection. *J Reprod Fertil.* 112:11-7.
- Wakayama, T., and R. Yanagimachi. 1998. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol.* 16:639-41.
- Wang, X., R.K. Sharma, S.C. Sikka, A.J. Thomas, Jr., T. Falcone, and A. Agarwal. 2003. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril.* 80:531-5.
- Ward, M.A., and W.S. Ward. 2004. A model for the function of sperm DNA degradation. *Reprod Fertil Dev.* 16:547-54.
- Ward, W.S. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod.* 16:30-6.

- Ward, W.S. 1994. The structure of the sleeping genome: implications of sperm DNA organization for somatic cells. *J Cell Biochem.* 55:77-82.
- Ward, W.S., and D.S. Coffey. 1989. Identification of a sperm nuclear annulus: a sperm DNA anchor. *Biol Reprod.* 41:361-70.
- Ward, W.S., and D.S. Coffey. 1991. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod.* 44:569-74.
- Ward, W.S., A.W. Partin, and D.S. Coffey. 1989. DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma.* 98:153-9.
- Ward, W.S., and A.O. Zalensky. 1996. The unique, complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 6:139-47.
- West, A., and J. Lahdetie. 2001. X-irradiation--induced changes in the progression of type B spermatogonia and preleptotene spermatocytes. *Mol Reprod Dev.* 58:78-87.
- Whittingham, D.G., S.P. Leibo, and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science.* 178:411-4.
- Williams, D.A., R.A. Beatty, and P.S. Burgoyne. 1970. Multivariate analysis in the genetics of spermatozoan dimensions in mice. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 174:313-31.
- Wolfe, H.G. 1967. Artificial insemination of the laboratory mouse (*Mus musculus*). *Lab Anim Care.* 17:426-32.
- Yaeram, J., B.P. Setchell, and S. Maddocks. 2006. Effect of heat stress on the fertility of male mice in vivo and in vitro. *Reprod Fertil Dev.* 18:647-53.
- Yamauchi, Y., A. Ajduk, J.M. Riel, and M.A. Ward. 2007a. Ejaculated and epididymal mouse spermatozoa are different in their susceptibility to nuclease-dependent DNA damage and in their nuclease activity. *Biol Reprod.* 77:636-47.
- Yamauchi, Y., J.A. Shaman, and W.S. Ward. 2007b. Topoisomerase II-mediated breaks in spermatozoa cause the specific degradation of paternal DNA in fertilized oocytes. *Biol Reprod.* 76:666-72.
- Yamauchi, Y., and M.A. Ward. 2007a. Preservation of Ejaculated Mouse Spermatozoa from Fertile C57BL/6 and Infertile Hook1/Hook1 Mice Collected from the Uteri of Mated Females. *Biol Reprod.*
- Yamauchi, Y., and M.A. Ward. 2007b. Preservation of ejaculated mouse spermatozoa from fertile C57BL/6 and infertile Hook1/Hook1 mice collected from the uteri of mated females. *Biol Reprod.* 76:1002-8.
- Yanagimachi, R. 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote.* 2:371-2.
- Yasuda, S.Y., N. Tsuneyoshi, T. Sumi, K. Hasegawa, T. Tada, N. Nakatsuji, and H. Suemori. 2006. NANOG maintains self-renewal of primate ES cells in the absence of a feeder layer. *Genes Cells.* 11:1115-23.

- Yildiz, C., P. Ottaviani, N. Law, R. Ayearst, L. Liu, and C. McKelvie. 2007. Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse. *Reproduction*. 133:585-95.
- Yin, X.M., Z.N. Oltvai, D.J. Veis-Novack, G.P. Linette, and S.J. Korsmeyer. 1994. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 59:387-93.
- Yin, Y., K.L. Hawkins, W.C. DeWolf, and A. Morgentaler. 1997. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl*. 18:159-65.
- Yokoyama, M., H. Akiba, M. Katsuki, and T. Nomura. 1990. [Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by in vitro fertilization using cryopreserved spermatozoa]. *Jikken Dobutsu*. 39:125-8.
- Young, K.E., W.A. Robbins, L. Xun, D. Elashoff, S.A. Rothmann, and S.D. Perreault. 2003. Evaluation of chromosome breakage and DNA integrity in sperm: an investigation of remote semen collection conditions. *J Androl*. 24:853-61.
- Zaccagnini, G., B. Maione, R. Lorenzini, and C. Spadafora. 1998. Increased production of mouse embryos in in vitro fertilization by preincubating sperm cells with the nuclease inhibitor aurintricarboxylic acid. *Biol Reprod*. 59:1549-53.
- Zavos, P.M., J.R. Correa, and P.N. Zarmakoupis. 1994. Improvements and short-term viability of mouse epididymal spermatozoa recovered through the Spermprep filtration method. *Theriogenology*. 42:1035-42.
- Zavos, P.M., J.R. Correa, and P.N. Zarmakoupis. 1995. Epididymal spermatozoa: recovery and subsequent improvements of mouse epididymal spermatozoa via the SpermPrep filtration method. *Tohoku J Exp Med*. 175:101-9.
- Zheng, P., R.D. Schramm, and K.E. Latham. 2005. Developmental regulation and in vitro culture effects on expression of DNA repair and cell cycle checkpoint control genes in rhesus monkey oocytes and embryos. *Biol Reprod*. 72:1359-69.
- Zhu, B., and S. Maddocks. 2005. The effect of paternal heat stress on protein profiles of pre-implantation embryos in the mouse. *Int J Androl*. 28:128-36.
- Zhu, B., S.K. Walker, H. Oakey, B.P. Setchell, and S. Maddocks. 2004. Effect of paternal heat stress on the development in vitro of preimplantation embryos in the mouse. *Andrologia*. 36:384-94.
- Zhu, B.K., and B.P. Setchell. 2004. Effects of paternal heat stress on the in vivo development of preimplantation embryos in the mouse. *Reprod Nutr Dev*. 44:617-29.
- Zini, A., R. Bielecki, D. Phang, and M.T. Zenzes. 2001. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril*. 75:674-7.
- Zini, A., J. Meriano, K. Kader, K. Jarvi, C.A. Laskin, and K. Cadesky. 2005. Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. *Hum Reprod*. 20:3476-80.

BIBLIOGRAFÍA

- Zini, A., M. San Gabriel, and A. Baazeem. 2009. Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. *J Assist Reprod Genet.* 26:427-32.
- Zribi, N., N. Feki Chakroun, H. El Euch, J. Gargouri, A. Bahloul, and L. Ammar Keskes. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril.* 93:159-66.
- Zúñiga, J.M., J.M. Orellana, and J.A. Tur. 2008. Ciencia y tecnología del animal de laboratorio: formación avanzada de postgrado. Universidad de Alcalá de Henares. 908 pp.

ANEXO I. ABREVIATURAS

ACE: enzima convertidora de angiotensinogeno
ADAM: a disintegrin and metalloproteinase
ADN: ácido desoxiribonucleico
ANOVA: análisis de varianza
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
AI: artificial insemination
ART: assisted reproductive techniques
Bax: BCL2-associated X protein
Bcl2: B-cell lymphoma 2
cDNA: ADN complementario
CMA3: cromomicina A3
COMET:
CP: crioprotector
¹³⁷**Cs:** Cesio ¹³⁷
DAPI: 4,6 diamino-2-phenylindole
DBD-FISH: detección mediante hibridación in situ de roturas del ADN (DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization)
DMSO: dimetilsulfóxido
D-PBS: Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DSBs: Double strand breaks
DTT: dithiothreitol
dUTP: desoxiuridina trifosfato
eCG: gonadotropina coriónica equina
EMMA: European Mouse Mutant Archive
Enzima TdT: enzima desoxinucleotidil transferasa terminal
Ep: epidídimo
ESCs: células madre embrionarias
FELASA: Federation of Laboratory Animal Science Associations
FITC: fluoresceína isotiocianato
FIV: fecundación *in vitro* (*in vitro* fertilization)
Gaj1: Gap junction membrane channel protein alpha 1
Gapdh: Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase
hCG: gonadotropina coriónica humana
H2az : Histone H2az
HG: Rafinosa-yema de huevo-glicerol (rafinose-egg yolk-glicerol)
HR: humedad relativa
HSP70: Proteína de choque térmico 70kDa(Heat shock proteína 70)
HTF: Human Tubal Fluid
IA: inseminación artificial
IAP: intracisternal A-particle

IATA: International Air Transport Association

ICM: masa celular interna (Inner Cell Mass)

ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides (Intracytoplasmic Sperm Injection)

INIA: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria

IOTS: Transferencia intraoviductal de espermatozoides

IP: Ioduro de Propidio

ISNT: Marcaje interno mediante desplazamiento de mella (In Situ Nick Translation)

KSOM: Kalium(K⁺)Simplex Optimized Medium

KSOM: Kalium(K⁺)Simplex Optimized Medium- Hepes

MuERV-L : murine endogenous retrovirus-L

NETs: entramados extracelulares neutrófilos (Neutrophil Extracellular Traps)

Nanog: Nanog homeobox

Oct3/4 (Pou5f1): POU domain, class 5, transcription factor 1

OMGs: organismos modificados genéticamente

OPS: open Pulled Straw

Ov: oviducto

PBS: Phosphate buffered saline

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

PLC: proteína de unión GTP y de la fosfolipasa C

p/v: peso/volumen

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (en tiempo real) (Quantitative Polymerase Chain Reaction)

RL: Rafinosa-leche descremada (rafinose-skimmed milk)

RLO: radicales libres de oxígeno

RT-qPCR: PCR cuantitativa asociada a retrotranscripción (Quantitative Reverse Transcription–PCR)

SCD Test: test de dispersión de la cromatina (Sperm Chromatin Dispersion Test).

SCGE o COMET: electroforesis de células individuales para el análisis del ADN (Single Cell Gel Electrophoresis)

SCSA: análisis de la estructura de la cromatina del espermatozoide (Sperm Chromatin Sperm Analysis)

SDS: dodecil sulfato sódico

TAE: tris-ácido acético-EDTA

TBE: tris-ácido bórico-EDTA

TE: trofoectodermo

TRAS: técnicas de Reproducción Asistida

Trf1: Telomeric repeat binding factor 1

TUNEL: marcaje del ADN en el extremo 3' terminal mediado por la enzima deoxinucleotidil transferasa (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labelling)

Uc: región del útero próxima al cérvix

ANEXO 1. ABREVIATURAS.

Uo: región del útero próxima a la unión útero-tubal

UT: unión utero-tubal

ZP: zona pelúcida

ANEXO II. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

FIG. 1 MODELO DE COMPACTACIÓN DE LA CROMATINA EN LAS CÉLULAS SOMÁTICAS (IZQUIERDA) Y EN LOS ESPERMATOZOIDES DE MAMÍFERO (DERECHA) (MODIFICADO DE BRAUN <i>ET AL.</i> 2001).....	72
FIG. 2 CRITERIO DE SELECCIÓN Y NÚMERO DE ESPERMATOZOIDES EN CADA UNO DE LOS SEGMENTOS DEL TRACTO REPRODUCTIVO.....	88
FIG. 3 DIFERENTES SECCIONES EN LAS QUE SE DIVIDIÓ EL TRACTO UTERINO PARA REALIZAR EL ANÁLISIS DE POBLACIONES ESPERMÁTICAS Y FRAGMENTACIÓN DE ADN.....	104
FIG. 4 IMÁGENES DE OVOCITOS FIJADOS EN GLUTARALDEHIDO AL 0,5% Y TEÑIDOS CON HOECHST PARA VISUALIZACIÓN DE ESPERMATOZOIDES ANCLADOS A LA ZP.	105
FIG. 5 IMAGEN DE UN GEL DE AGAROSA (0,5%) TRAS REVELADO CON BROMURO DE ETÍDIO (1 µg/ml) Y ELECTROFORESIS ALCALINA. C: ADN EXTRAÍDO DE ESPERMATOZOIDES PROCEDENTES DEL GRUPO CONTROL; H: ADN EXTRAÍDO DE ESPERMATOZOIDES PROCEDENTES DEL GRUPO DE ESTRÉS TÉRMICO ESCROTAL; Γ: ADN EXTRAÍDO DE ESPERMATOZOIDES PROCEDENTES DEL GRUPO DE RADIACIÓN IONIZANTE. L: MARCADORES DE PESO MOLECULAR.	107
FIG. 6 COMPARACIÓN HISTOLÓGICA DE TÚBULOS SEMINÍFEROS PROCEDENTES DE TESTÍCULOS. GRUPO CONTROL (A, B); TESTÍCULOS 21-25 DÍAS DESPUÉS DE TRATAMIENTOS A 42°C, 30 MIN (C, D) Y TESTÍCULOS 21-25 DÍAS DESPUÉS DE TRATAMIENTO CON RADIACIÓN IONIZANTE (E, F). TINCIÓN HEMATOXILINA/EOSINA. FLECHAS INDICAN CÉLULAS PICNÓTICAS. ESCALA 50 µM.	111
FIG. 7 PORCENTAJE DE FETOS Y REABSORCIONES OBSERVADAS EN HEMBRA EN DÍA 14 POST-COITO, GRUPO CONTROL (N=13, 13 DE 13 PREÑADAS), ESTRÉS TÉRMICO ESCROTAL (N=18, 6 DE 18 PREÑADAS) Y RADIACIÓN IONIZANTE (N=12, 12 DE 12 PREÑADAS).....	112
FIG. 8 PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES CON ADN DAÑADO EXPRESADO EN FORMA DE LONGITUD DE COLA TRAS COMET RECOLECTADOS DE LAS DIFERENTES SECCIONES UTERINAS Y DEL PROPIO EPIDÍDIMO DE MACHOS TRATADOS.....	113
FIG. 9 PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES CON ADN DAÑADO EXPRESADO EN FORMA DE LONGITUD DE COLA TRAS COMET RECOLECTADOS DE LAS DIFERENTES SECCIONES UTERINAS Y DEL PROPIO EPIDÍDIMO DE MACHOS TRATADOS.....	114
FIG. 10 ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL SEGUIDO PARA EL DESARROLLO DE LA PRIMERA PARTE DE ESTE CAPÍTULO. SISTEMA EMPLEADO PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS, PROCESADO Y CONGELACIÓN DE LAS MISMAS.....	129

FIG. 11 ESQUEMA DE LOS PROCESOS DE CONGELACIÓN (A) Y DESCONGELACIÓN (B) LLEVADOS A CABO DURANTE EL DESARROLLO EXPERIMENTAL DE ESTE CAPÍTULO.	130
FIG. 12 ESQUEMA DE FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i>	130
FIG. 13 IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE A) ESPERMATOZOIDES TUNEL POSITIVOS (FLECHA) Y B) ESPERMATOZOIDES SOBRE LOS QUE SE HA REALIZADO COMET (FLECHAS) PARA ANALIZAR LA FRAGMENTACIÓN DE ADN	131
FIG. 14 ESQUEMA PARA LOS PROCEDIMIENTOS DE INSEMINACIÓN LLEVADOS A CABO DURANTE EL DESARROLLO EXPERIMENTAL DE ESTE TRABAJO.....	132
FIG. 15 ESQUEMA DE REACCIÓN DE INCORPORACIÓN DE NUCLEÓTIDOS MARCADOS CON FITC EN LAS ZONAS DE ROTURA DENTRO DE UNA DOBLE HEBRA DE ADN.....	136
FIG. 16 PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES CON MEMBRANA INTEGRAS (VIVOS) TRAS REALIZARSE ANÁLISIS DE LA INTEGRIDAD DE MEMBRANA ESPERMÁTICA UTILIZANDO EL KIT LIVE/DEATH (ROCHE).	139
FIG. 17 PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES MÓTILES (MÓTILES PROGRESIVOS) TRAS ANÁLISIS MEDIANTE COMPUTER SPERM SYSTEM ANALYSIS (CASA).....	140
FIG. 18 PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES CON ACROSOMA INTACTO TRAS REALIZARSE VALORACIÓN AL MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES Y FIJACIÓN CON GLUTARALDEHIDO AL 2,5%.....	141
FIG. 19 PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES TUNEL POSITIVOS TRAS REALIZARSE ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO UTILIZANDO EL KIT IN SITU CELL DETECTION DEATH (ROCHE)..	142
FIG. 20 REPRESENTACIÓN DE HISTOGRAMA DE FRECUENCIAS DE POBLACIONES DE ESPERMATOZOIDES DE LA ESTIRPE B6CBAF1 CON VALORES DE LONGITUD DE COLA COMPRENDIDOS EN LOS DISTINTOS RANGOS ANALIZADOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE SCGE (COMET).	143
FIG. 21 REPRESENTACIÓN DE HISTOGRAMA DE FRECUENCIAS DE POBLACIONES DE ESPERMATOZOIDES DE LA ESTIRPE C57BL/6 CON VALORES DE LONGITUD DE COLA COMPRENDIDOS EN LOS DISTINTOS RANGOS ANALIZADOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE SCGE (COMET)	143
FIG. 22 PORCENTAJE DE FECUNDACIÓN TRAS LA REALIZACIÓN DE FIV CON ESPERMA CONGELADO Y FRESCO.	144
FIG. 23 PORCENTAJE DE FECUNDACIÓN TRAS LA REALIZACIÓN DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL OVIDUCTAL CON DIFERENTES DOSIS DE	

ESPERMA FRESCO DE LAS ESTIRPES B6CBAF1 Y C57BL/6 Y OVOCITOS DE LAS MISMAS ESTIRPES EN COMBINACIÓN FACTORIAL.	145
FIG. 24 PORCENTAJE DE FECUNDACIÓN OBTENIDO TRAS INSEMINAR HEMBRAS B6CBAF1 CON ESPERMATOZOIDES B6CBAF1 FRESCOS (CONTROL), B6CBAF1 CONGELADOS (CONTROL CONGELADO) Y C57BL/6 (PROBLEMA).	146
FIG. 25 ESQUEMA DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL. PARTE A: OBTENCIÓN DE EMBRIONES Y TRANSPORTE SIMULADO.	161
FIG. 26 ESQUEMA DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL. PARTE B: RECOLECCIÓN DE EMBRIONES TRAS TRANSPORTE, CULTIVO <i>IN VITRO</i> Y DESARROLLO POST-IMPLANTACIONAL.	161
FIG. 27 DETALLE DEL INFUNDÍBULO (CIRCULO). SE PUEDEN OBSERVAR LAS DIFERENTES CIRCUNVOLUCIONES DEL OVIDUCTO QUE LE DAN UN ASPECTO DE OVILLO Y QUE SE MANTIENEN EN POSICIÓN PRÓXIMA AL OVARIO MERCED A LA BOLSA OVÁRICA (BOV).	163
FIG. 28 DETALLE DEL ÁMPULA. ES EN ESTE LUGAR DONDE SE ENCUENTRAN LOS OVOCITOS Y LOS CIGOTOS EN LAS 14-17 H DESPUÉS DE LA INYECCIÓN DE HCG.	164
FIG. 29 DESARROLLO EXPERIMENTAL DE LA TINCIÓN DIFERENCIAL CÉLULAS MASA INTERNA CELULAR (ICM)/ TROFOECTODERMO (TE).	165
FIG. 30 PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ARN MENSAJERO PROCEDENTE DE EMBRIONES MEDIANTE BOLAS MAGNÉTICAS.	166
FIG. 31 PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN INVERSA Y CUANTIFICACIÓN DE TRANSCRITOS MEDIANTE QPCR.	167
FIG. 32 PERFIL DE TEMPERATURAS UTILIZADO DURANTE LAS REACCIONES DE QPCR.	168
FIG. 33 DESARROLLO DE MÓRULAS (DESARROLLADAS <i>IN VIVO</i>) Y ALMACENADAS DURANTE 24 H EN KSOM Y KSOM-H A 4°, 15° Y 37°C.	169
FIG. 34 DESARROLLO DE MÓRULAS (DESARROLLADAS <i>IN VIVO</i>) Y ALMACENADAS DURANTE 48 H EN KSOM Y KSOM-H A 4°, 15° Y 37°C.	170
FIG. 35 NUMERO DE CÉLULAS DE LA ICM, TE Y NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS PROCEDENTES DE BLASTOCISTOS DESARROLLADOS DESPUÉS DE HABER TRANSPORTADO DURANTE 24 H, MÓRULAS DESARROLLADAS <i>IN VIVO</i>	171
FIG. 36. NUMERO DE CÉLULAS DE LA ICM, TE Y NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS PROCEDENTES DE BLASTOCISTOS DESARROLLADOS DESPUÉS	

DE HABER TRANSPORTADO DURANTE 48 H, MÓRULAS DESARROLLADAS <i>IN VIVO</i>	171
FIG. 37 NUMERO DE FETOS, REABSORCIONES E IMPLANTACIONES TOTALES DESPUÉS DE 14 DÍAS DE GESTACIÓN DE LAS TRANSFERENCIAS REALIZADAS A HEMBRAS PSEUDOGESTANTES (0,5 DPC) DE MÓRULAS (DESARROLLADAS <i>IN VIVO</i>) Y TRANSPORTADAS DURANTE 24 H.	172
FIG. 38 NUMERO DE FETOS, REABSORCIONES E IMPLANTACIONES TOTALES DESPUÉS DE 14 DÍAS DE GESTACIÓN DE LAS TRANSFERENCIAS REALIZADAS A HEMBRAS PSEUDOGESTANTES (0,5 DPC) DE MÓRULAS (DESARROLLADAS <i>IN VIVO</i>) Y TRANSPORTADAS DURANTE 48 H.	173
FIG. 39. EXPRESIÓN RELATIVAS DE TRANSCRITOS RELACIONADOS CON APOPTOSIS ANALIZADOS EN BLASTOCISTOS DESARROLLADOS DESPUÉS DE 24 H DE CULTIVO PROCEDENTES DE MÓRULAS DESARROLLADAS <i>IN VIVO</i> Y TRANSPORTADAS DURANTE 48 H.	173
FIG. 40 EXPRESIÓN RELATIVAS DE TRANSCRITOS RELACIONADOS CON RETROTRANSPONES ANALIZADOS EN BLASTOCISTOS DESARROLLADOS DESPUÉS DE 24 H DE CULTIVO PROCEDENTES DE MÓRULAS DESARROLLADAS <i>IN VIVO</i> Y TRANSPORTADAS DURANTE 48 H.	174
FIG. 41 EXPRESIÓN RELATIVAS DE TRANSCRITOS RELACIONADOS CON PLURIPOTENCIA, COMUNICACIÓN INTERCELULAR Y METABOLISMO ANALIZADOS EN BLASTOCISTOS DESARROLLADOS DESPUÉS DE 24 H DE CULTIVO PROCEDENTES DE MÓRULAS DESARROLLADAS <i>IN VIVO</i> Y TRANSPORTADAS DURANTE 48 H.	175
FIG. 42. DESARROLLO DE MÓRULAS (DESARROLLADAS <i>IN VITRO</i>) Y ALMACENADAS DURANTE 24 H EN KSOM Y KSOM-H A 4°, 15° Y 37°C.	175
FIG. 43. NUMERO DE CÉLULAS DE LA ICM, TE Y NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS PROCEDENTES DE BLASTOCISTOS DESARROLLADOS DESPUÉS DE HABER TRANSPORTADO DURANTE 24 H, MÓRULAS DESARROLLADAS <i>IN VITRO</i>	176
FIG. 44. NUMERO DE FETOS, REABSORCIONES E IMPLANTACIONES TOTALES DESPUÉS DE 14 DÍAS DE GESTACIÓN DE LAS TRANSFERENCIAS REALIZADAS A HEMBRAS PSEUDOGESTANTES (0,5 DPC) DE MÓRULAS (DESARROLLADAS <i>IN VITRO</i>) Y TRANSPORTADAS DURANTE 24 H.	177
FIG. 45 DESARROLLO DE MÓRULAS (DESARROLLADAS <i>IN VIVO</i>) Y TRANSPORTADAS DURANTE 24 H DENTRO DEL OVIDUCTO EN KSOM-H A 4°C.	178
FIG. 46. NUMERO DE CÉLULAS DE LA ICM, TE Y NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS PROCEDENTES DE BLASTOCISTOS DESARROLLADOS DESPUÉS DE HABER TRANSPORTADO DURANTE 24 H CONTENIDOS EN EL OVIDUCTO.	179

FIG. 47 NUMERO DE FETOS, REABSORCIONES E IMPLANTACIONES TOTALES DESPUÉS DE 14 DÍAS DE GESTACIÓN DE LAS TRANSFERENCIAS REALIZADAS A HEMBRAS PSEUDOGESTANTES (0,5 DPC) DE MÓRULAS (DESARROLLADAS <i>IN VIVO</i>) Y TRANSPORTADAS DURANTE 24 H CONTENIDAS EN LOS OVIDUCTOS.....	180
--	-----

TABLAS

TABLA 1 TÉCNICAS MÁS COMUNES UTILIZADAS PARA LA DETECCIÓN DE ANOMALÍAS EN LA CROMATINA ESPERMÁTICA: PRINCIPIO DE LA TÉCNICA, TIPO DE DAÑO EVALUADO Y MÉTODO COMÚN DE DETECCIÓN.....	81
--	----

TABLA 2 EFECTO DEL TRATAMIENTO SOBRE EL PESO CORPORAL, TESTICULAR Y EPIDIDIMARIO ASÍ COMO CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS (MOTILIDAD Y CONCENTRACIÓN).....	109
--	-----

TABLA 3 EFECTO DEL ESTRÉS TÉRMICO ESCROTAL Y RADIACIÓN Γ SOBRE EL PARÁMETRO LONGITUD DE DE COLA EN LOS ANÁLISIS DE COMET (PH 8) DE ESPERMATOZOIDES RECOLECTADOS DEL EPIDÍDIMO Y DE LAS DIFERENTES SECCIONES UTERINAS.	112
--	-----

TABLA 4 EFECTO DEL ESTRÉS TÉRMICO ESCROTAL Y RADIACIÓN Γ SOBRE LOS PARÁMETROS LONGITUD DE DE COLA Y MOMENTO DE COLA EN LOS ANÁLISIS DE COMET (PH 8) DE ESPERMATOZOIDES ANCLADOS A LA ZONA PELÚCIDA (ZP) O NO ANCLADOS (FIV) DESPUÉS DE FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i>	114
---	-----

TABLA 5 PORCENTAJE DE OVOCITOS FECUNDADOS Y DESARROLLO HASTA BLASTOCISTO DE LOS MISMOS EN FUNCIÓN DE LA TÉCNICA DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA UTILIZADA Y EL TIPO DE ESPERMA APLICADA EN CADA CASO.	115
--	-----

TABLA 6 OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN QPCR.....	167
---	-----

ANEXO III. PUBLICACIONES Y CONGRESOS

PUBLICACIONES

Miriam Pérez-Crespo, Juan de Dios Hourcade, Raúl Fernández-González, Miguel Angel Ramirez and Alfonso Gutiérrez-Adán. **The impact of sperm DNA integrity on embryo quality and development in the era of assisted reproduction: Lessons from the Mouse. Reviews on Basic Andrology** 169-181. RESEARCH SINGPOST. 2007

Miriam Pérez-Crespo, Juan de Dios Hourcade, Raúl Fernández-González B. Pintado and Alfonso Gutiérrez-Adán. **Can the uterus select the sperm with non-fragmented DNA?** AETE Newsletter nº27, 2007

Raúl Fernández-González, Pedro Nuno Moreira, Miriam Pérez-Crespo, Manuel Sánchez-Martín, Miguel Ángel Ramírez, Eva Pericuesta, Ainhoa Bilbao, Pablo Bermejo-Álvarez, Juan de Dios Hourcade, Fernando Rodríguez de Fonseca, and Alfonso Gutiérrez-Adán. **Long-Term Effects of Mouse Intracytoplasmic Sperm Injection with DNA Fragmented Sperm on Health and Behavior of Adult Offspring.** Biology of Reproduction 761- 772, 2008

Eva Pericuesta, Miguel Ángel Ramírez, Raúl Fernández-González, Miriam Pérez-Crespo, Juan de Dios Hourcade, Pablo Bermejo-Álvarez, Dimitrios Rizos, and Alfonso Gutiérrez-Adán. **Telomere lengthening during preimplantation development. Association Europeenne de transfert embryonnaire A.E.T.E. Newsletters** 29

Eva Pericuesta, Miguel Ángel Ramírez, Raúl Fernández-González, Miriam Pérez-Crespo, Juan de Dios Hourcade, Pablo Bermejo, Dimitrios Rizos, and Alfonso Gutiérrez Adán. **Telomere lengthening from oocyte to embryonic stem cell.** NOVA MEDICAL Telomeres: Function, Shortening and Lengthening, 2009

Raúl Fernández-González, Juan de Dios Hourcade, Irene López-Vidriero, Alberto Benguría, Fernando Rodríguez De Fonseca, Alfonso Gutiérrez-Adán. **Analysis of gene transcription alterations at the blastocyst stage related to the long term consequences of in vitro culture in mice.** Reproduction,137; 271-283. 2009

Juan de Dios Hourcade, Miriam Pérez Crespo, Belén Pintado y Alfonso Gutierrez-Adán. **Selection against spermatozoa with fragmented DNA after postovulatory mating depends on the type of damage.** Reproductive Biology and Endocrinology Jan 31;8:9. 2010

Juan Carlos Martínez-Soto, Juan de Dios Hourcade, Alfonso Gutiérrez-Adán, José Landeras, Joaquín Gadea. **Effect of genistein supplementation of thawing medium on characteristics of frozen human spermatozoa.** Asian Journal of Andrology. May;12(3):431-41. 2010

CONGRESOS

Raquel Mateos, Juan de Dios Hourcade, Mario. Alía, Elena Lecumberri, Sonia Ramos, Luis Goya, Laura Bravo. **METABOLISM OF POLYPHENOLS IN A HUMAN HEPATOMA CELL LINE (HEP G2)** I International Congress on Polyphenols and Health Vichy, Francia 18-21 Noviembre 2003 POSTER

Laura Bravo, Mario Alía, Raquel Mateos, Juan de Dios Hourcade, Elena Lecumberri, Sonia Ramos, Luis Goya **PRESENCE OF QUERCETIN-4-O-RHAMNOGLUCOSIDE (RUTIN) IN THE RAT LIVER** I International Congress on Polyphenols and Health Vichy, Francia 18-21 Noviembre 2003 POSTER

Mario Alía, Elena Lecumberri, Raquel Mateos, Sonia Ramos, Juan de Dios Hourcade, Laura Bravo, Luis Goya **QUERCETIN PROTECTS HUMAN HEPATOMA CELL LINE HEPG2**

AGAINST OXIDATIVE STRESS INDUCED BY TERTBUTYL HYDROPEROXIDE I
International Congress on Polyphenols and Health Vichy, Francia 18-21 Noviembre 2003

Juan de Dios Hourcade, Raquel Mateos, Luis Goya, Laura Bravo **ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD UDP-GLUCURONOSIL TRANSFERASA HEPÁTICA EN HÍGADO DE RATA Y EN UNA LINEA DE HEPATOMA HUMANO HEPG2. APLICACIÓN EN EL METABOLISMO DE LA QUERCETINA** XXVIII Congreso de la SEBBM Zaragoza, España 12-15 Septiembre 2005 POSTER

Juan de Dios Hourcade, Javier Hernández-Sánchez, Miriam Pérez-Crespo, Alfonso Gutiérrez-Adán, Belén Pintado **CONTRIBUTION OF DNA FRAGMENTATION TO THE LOW POST-THAW QUALITY OF C57BL6 SPERMATOCYTES** X International Symposium of Spermatology El Escorial, Madrid, España 17-22 Septiembre 2006 POSTER

Pedro Nuno Moreira, Raúl Fernández-González, Miriam Pérez-Crespo, Pablo Bermejo, Juan de Dios Hourcade, Raquel Rey, Alfonso Gutiérrez-Adán **UNEXPECTED SEVERE ABNORMALITIES IN MOUSE ROSA OFFSPRING** 33rd Annual Conference of the International Embryo Transfer Society **Reproduction, Fertility and Development**, Proceedings of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Kyoto, Japon, 7-9 January 2007 POSTER

Juan de Dios Hourcade, Belén Pintado. **MOUSE EMBRYO SURVIVAL AFTER 24 HOURS SHIPMENT SIMULATED IN SEVERAL CONDITIONS** Annual Meeting FELASA-ICLAS Cernobbio, Milan. Italia 11-14 Junio 2007 POSTER

Belen Pintado; Juan de Dios Hourcade; Raquel Rey; Antonia Calero; Ignacio Segovia; Alfonso Gutiérrez-Adán. **EMBRYO TRANSFER PROCEDURE AND ITS EFFECTS ON THE FINAL EFFICIENCY OF TRANSGENIC MICE PRODUCTION.** Annual Meeting FELASA-ICLAS Cernobbio, Milan. Italia. 11-14 Junio 2007. POSTER

Juan de Dios Hourcade; Miriam Pérez-Crespo; Alfonso Gutiérrez-Adán; Belén Pintado **DIFFERENTIAL PROPORTION OF DNA-DAMAGED SPERMATOCYTES COLLECTED FROM EPIDIDYMAL CAUDAE IN MALES OR UTERINE HORNS AND OVIDUCTS OF NATURALLY MATED MICE.** 40th Annual Meeting of Society for Study of Reproduction. **Biology of Reproduction.** San Antonio, Texas, EEUU. 21-25 Julio 2007. Comunicación Oral.

Raúl Fernández-González; Miguel Angel Ramirez; Miriam Pérez-Crespo; Eva Pericuesta; Pablo Bermejo-Álvarez; Juan de Dios Hourcade; Belen Pintado; Alfonso Gutiérrez-Adán. **TRANSGENERATIONAL EPIGENETIC ALTERATIONS IN MICE PRODUCED BY IN VITRO CULTURE.** 40th Annual Meeting of Society for Study of Reproduction. **Biology of Reproduction.** San Antonio, Texas, EEUU. 21-25 Julio 2007. Comunicación Oral.

Raúl Fernández-González; Miguel Angel Ramirez; Miriam Pérez-Crespo; Eva Pericuesta; Pablo Bermejo-Álvarez; Juan de Dios Hourcade; Belen Pintado; Alfonso Gutiérrez-Adán **INHERITANCE OF EPIGENETIC ALTERATIONS PRODUCED BY IN VITRO CULTURE IN MICE.** 23rd Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association. Alghero, Sardinia, Italy. 7-8 September 2007. POSTER

Miguel Angel Ramirez; Eva Pericuesta; Raúl Fernández-González; Juan de Dios Hourcade; Alfonso Gutiérrez-Adán. **GERM CELLS CULTURE MEDIA FACILITATE THE REPROGRAMMING TO PRODUCE NEW MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS.** WORKSHOP REGULATION OF PLURIPOTENCY DURING LIFE CYCLE: IMPLICATIONS FOR EMBRYONIC DEVELOPMENT AND REGENERATIVE MEDICINE. Baeza, Jaen, Spain. 1-3 Octubre 2007. POSTER

Raúl Fernández-González; Juan de Dios Hourcade; Miriam Pérez-Crespo; Manuel Sánchez Martín; Isidro Sánchez-García; Ainhoa Bilbao; Fernando Rodríguez de Fonseca; Belen Pintado; Alfonso Gutiérrez-Adán. **LOSS OF TELOMERES MEDIATES THE LONG TERM EFFECTS**

PRODUCED BY ICSI WITH FROZEN SPERM IN MICE. II INTERNATIONAL MEETING ON MAMMALIAN EMBRYOGENOMICS. :Paris, France. 17-20 Octubre 2007. POSTER

Raúl Fernandez-Gonzalez; Miriam Pérez-Crespo; Pablo Bermejo, Juan de Dios Hourcade, Belén Pintado; Alfonso Gutierrez-Adán. **USE OF AXIN^{fu} MUTATION MODEL TO ANALYZE PREIMPLANTATION EPIGENETIC ALTERATIONS PRODUCED BY *IN VITRO* CULTURE IN MICE.** II INTERNATIONAL MEETING ON MAMMALIAN EMBRYOGENOMICS. Paris, France. 17-20 Octubre 2007. POSTER

Alcia de Diego; Juan de Dios Hourcade; Patri Vergara; Alfonso Gutierrez-Adán; Belén Pintado. **SUPERVIVENCIA *IN VITRO* DE EMBRIONES DE RATÓN CONGELADOS POR EL MÉTODO DE LA CONGELACIÓN RÁPIDA EN DIFERENTES ESTADIOS.** IX Congreso de la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Experimentacion. Córdoba, España. 20-23 Noviembre 2007. POTER

Juan de Dios Hourcade, Miriam Perez-Crespo, Belen Pintado, Alfonso Gutierrez-Adan **SCREENING ABILITY OF FEMALE REPRODUCTIVE TRACT FOR FRAGMENTED DNA SPERMATOZOA DEPENDS ON THE SOURCE OF DAMAGE.** 41st Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction. Kona Big Island, Hawaii. Mayo 2008. POTER

Juan de Dios Hourcade, Miriam Perez-Crespo, Belen Pintado, Alfonso Gutierrez-Adan. **CAN THE FEMALE REPRODUCTIVE TRACT AND THE ZONA PELLUCIDA SELECT DNA NON-FRAGMENTED SPERMATOZOA?** Cost Action FA0702 First General Conference. Volos, Grecia. Octubre 2008. POTER

Juan de Dios Hourcade, Miriam Perez-Crespo, Belen Pintado, Alfonso Gutierrez-Adan **INTRAoviductal Insemination with Frozen C57BL/6 Sperm Increases Fertility Rate Compared to Standard IVF.** 8th International Transgenic Technology Meeting.Toronto, *Transgenic Research*. Toronto, Canadá. Octubre 2008. POSTER

Juan de Dios Hourcade, Alfonso Gutiérrez-Adán, Belén Pintado **Effects of cryoprotectant and freezing rate on sperm quality and in vitro fertilization in C57 mice** Asociacion Española de Reproduccion Animal (AERA) Animal Reproduction Science Gijon, Spain Octubre 2008 POSTER

Juan de Dios Hourcade, Miriam Pérez-Crespo, Belén Pintado, Alfonso Gutiérrez-Adán **SELECTION OF NON-FRAGMENTED DNA SPERMATOZOA FROM HEAT STRESSED MICE BY FEMALE REPRODUCTIVE TRACT AND ZONA PELLUCIDA BINDING** International Embryo Transfer Society (IETS) *Reproduction, Fertility and Development* San Diego, California, EEUU. Enero, 2009 *COMUNICACIÓN ORAL, finalista competición estudiantes.*

Juan Carlos Martínez-Soto, Juan de Dios Hourcade, Alfonso Gutiérrez-Adán, José Landeras, Joaquín Gadea **SUPPLEMENTATION OF THE DILUTION MEDIUM AFTER THAWING WITH GENISTEIN REDUCES DNA DAMAGE AND ROS GENERATION OF FROZEN-THAWED HUMAN SPERMATOZOA** European Society of Human Reproduction and Embriology (ESHRE) Human Reproduction Amsterdam, Holanda Junio-Julio 2009 POSTER

Raúl Fernandez-Gonzalez, Miriam Perez Crespo, Juan de Dios Hourcade, Antonia Calero Prieto, Alexandra Calle, and Alfonso Gutiérrez-Adán **DIFFERENTIAL HISTONE MODIFICATIONS MARK MOUSE METASTABLE EPIALLELE AXINFU DURING EMBRYO PRE-IMPLANTATION** 42st Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction Biology of Reproduction Pittsburgh, Pensilvania, EEUU Julio, 2009. POSTER